

ANALYSE VON AMINOSÄURESUBSTITUTIONEN IM THYMIDINKINASE-GEN VON  
HERPES-SIMPLEX-VIREN HINSICHTLICH IHRER BEDEUTUNG FÜR EINE  
RESISTENZ GEGENÜBER VIROSTATIKA

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Marisa Theresa Kaspar  
geboren am 14. August 1991 in Bad Windsheim**

## **Gutachter**

**1. Prof. Dr. Andreas Sauerbrei, Jena**

**2. Prof. Dr. Bettina Löffler, Jena**

**3. Prof. Dr. Barbara Schmidt, Regensburg**

**Tag der öffentlichen Verteidigung: 02. Mai 2017**

**Examen: 06. Dezember 2017**

# Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>3</b>
2.1	Humanpathogene Herpesviren	3
2.2	Herpes-simplex-Virus	4
2.3	Geschichtlicher Hintergrund	4
2.4	Virusgenom	5
2.5	Virusmorphologie	8
2.6	Epidemiologie und Übertragung	9
2.7	Pathogenese und Replikation	10
2.8	Klinik der Herpes-simplex-Virus-Infektionen	14
2.9	Labordiagnostik	17
2.10	Antivirale Therapie	17
2.11	Resistenzen gegenüber Virostatika	21
<b>3</b>	<b>Zielstellung</b>	<b>26</b>
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>28</b>
4.1	Untersuchte Aminosäuresubstitutionen	28
4.2	Kontrollproben	29
4.3	Materialien und Geräte	31
4.4	Site-directed Mutagenesis	35
4.5	Aufreinigung der Amplifikate	40
4.6	<i>In vitro</i> Rekombinationsreaktion	42
4.7	Transformation in DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup> -T1 <sup>®</sup> <i>Escherichia coli</i>	42
4.8	Überprüfung der Mutagenese und Anlegen einer Vorkultur	43
4.9	Sequenzierung	44
4.10	Anlegen einer Hauptkultur und Plasmid-Midi-Präparation	45
4.11	Zellfreie Synthese rekombinanter Proteine	46
4.12	Herstellung kompetenter BL21(DE3) <i>Escherichia coli</i>	47
4.13	<i>In vivo</i> Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine	48
4.14	Bradford-Test	49
		III

4.15	Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis	50
4.16	Visualisierung der Proteine	51
4.17	DiviTum <sup>TM</sup> -Assay	52
4.18	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie/UV-Spektrometrie	55
4.19	Flüssigchromatographie/Massenspektrometrie	57
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>59</b>
5.1	Site-directed mutagenesis	59
5.2	Anzucht in Escherichia coli	60
5.3	Sequenzierung des Thymidinkinasegens	62
5.4	Visualisierung der <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> exprimierten Proteine	63
5.5	DiviTum <sup>TM</sup> -Test	70
5.6	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie/UV-Spektrometrie	83
5.7	Flüssigchromatographie/Massenspektrometrie	90
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>96</b>
6.1	Herstellung und Überprüfung rekombinanter Proteine	97
6.2	Messung der Thymidinkinaseaktivität	102
6.3	Interpretation der Ergebnisse	110
<b>7</b>	<b>Schlussfolgerung</b>	<b>129</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>131</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b>	<b>154</b>
9.1	Tabellenverzeichnis	154
9.2	Abbildungsverzeichnis	158
9.3	Danksagung	163
9.4	Ehrenwörtliche Erklärung	164

## **I      Abkürzungsverzeichnis**

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
Abb.	Abbildung
ACV	Aciclovir
ACV-MP	Aciclovirmonophosphat
ACV-TP	Aciclovirtriphosphat
AG	Antigen
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest.	Aqua bidestillata, zweifach destilliertes Wasser
Area%	Prozentualer Anteil einer Peakfläche im HPLC/UV-Chromatogramm
AS	Aminosäure
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat
bp	Basenpaare
BrdU	5-Brom-2-desoxyuridin
BSA	Bovine Serum Albumine, Rinderserumalbumin
BVDU	5-(2-Bromvinyl)-2'-desoxyuridin, Brivudin
c	Konzentration
CDV	Cidofovir
CMV	Zytomegalievirus
CPS	Counts per Second, Zählungen pro Sekunde
Da	Dalton
DAD	Diodenarraydetektor
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DP	Diphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
dT	Desoxythymidin
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ESI	Elektronensprayionisation
EtBr	Ethidiumbromid
FCV	Famciclovir
FOS	Trinatrium-Phosphono-Formiat, Foscarnet
g	Gramm
gB/C/D/E/G/H/I/L	Glykoprotein B/C/D/E/G/H/I/L
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HHV-6	Humanes Herpesvirus 6
HHV-7	Humanes Herpesvirus 7
HHV-8	Humanes Herpesvirus 8
His <sub>6</sub> -tag	6x-Histidin-Adaptersequenz
HK	Hauptkultur
HL	Hyper Ladder I
HPI	Helikase-Primase-Inhibitoren
HPLC/UV	High Performance Liquid Chromatography/Ultraviolet Spectroscopy, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie/Ultraviolettspektroskopie
HSV-1	Herpes-simplex-Virus Typ 1
HSV-2	Herpes-simplex-Virus Typ 2
IC <sub>50</sub>	Inhibitory Concentration 50%, Konzentration bei 50%iger Inhibition
IC <sub>90</sub>	Inhibitory Concentration 90%, Konzentration bei 90%iger Inhibition
IFT	Immunfluoreszenztest

IgG/M	Immunglobulin G/M
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
IR	Internal Repeat
kb	Kilobasenpaar
$k_{\text{cat}}$	katalytische Konstante
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
kR	konservierte Region
l	Liter
LAT	Latenz-assoziiertes Transkript
LB	Lysogeny Broth
LC	Flüssigchromatographie
LC/MS/MS	Flüssigchromatographie/Triple-Quadrupol-Tandemmassenspektrometrie
LP	Ladepuffer
M	molar
mA	Milliampere
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
miRNA	microRNA
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
MP	Monophosphat
m/z	Masse zu Ladungs-Verhältnis
n	Stoffmenge
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NBS	Nukleosid-Bindestelle der Thymidinkinase
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
n.d.	nicht durchgeführt/nicht durchführbar
NK	Negativkontrolle
nkR	nicht konservierte Region

nm	Nanometer
Nr.	Nummer
nt	Nukleotid
OD	Optische Dichte
OF	overflow, Messbereichsüberschreitung
oriL/S	Origin of Replication im langen Segment/kurzen Segment
ORF	Open Reading Frame
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PCV	Penciclovir
PK	Positivkontrolle
p-NPP	p-Nitrophenylphosphat
Pol	Polymerase
Pol <sup>r</sup>	Resistenzmutation in der Polymerase
Pol <sup>u</sup>	unklare Mutation in der Polymerase
PSI	Pounds per square inch, Pfund pro Quadratzoll
Reag A	Reagenz A
Reag B	Reagenz B
RK	Resistenzkontrolle
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S.	Seite
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Sodium Dodecylsulfate
SDS-PAGE	Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SOC	Super Optimal Broth with Catabolite Repression
Tab.	Tabelle
Taq-Polymerase	DNA-Polymerase des <i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBST	Tris-buffered Saline mit Tween 20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer



TIF	$\alpha$ -Trans-Inducing-Factor
TK	Thymidinkinase
TK <sup>A</sup>	Thymidinkinase mit veränderter Substratspezifität
TK <sup>R</sup>	Thymidinkinase mit reduzierter Phosphorylierungsaktivität
TK <sup>r</sup>	Resistenzmutation in der Thymidinkinase
TK <sub>s</sub>	Polymorphismus in der Thymidinkinase.
TK <sup>u</sup>	Unklare Mutation in der Thymidinkinase
TK <sup>-</sup>	Thymidinkinase ohne Phosphorylierungsaktivität
TP	Triphosphat
TR	Terminal Repeat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TR <sub>L</sub>	Terminal Repeat, Long Segment
TR <sub>s</sub>	Terminal Repeat, Short Segment
U	Unit, Enzymeinheit
ÜK	Übernachtkultur
U <sub>L</sub> -Region	Unique Long-Region
UMP	Uridinmonophosphat
U <sub>s</sub> -Region	Unique Short-Region
V	Volt
VACV	Valaciclovir
VHS	Virion-Host-Shutoff-Protein
VK	Vorkultur
VZV	Varicella-Zoster-Virus
WT	Wildtyp
x g	mal Erdbeschleunigung
ZNS	Zentrales Nervensystem
zPK	zusätzliche Positivkontrolle
zRK	zusätzliche Resistenzkontrolle

**Aminosäuren**

Ala, A	Alanin
Arg, R	Arginin
Asn, N	Asparagin
Asp, D	Asparaginsäure
Cys, C	Cystein
Gln, Q	Glutamin
Glu, E	Glutaminsäure
Gly, G	Glycin
His, H	Histidin
Ile, I	Isoleucin
Leu, L	Leucin
Lys, K	Lysin
Met, M	Methionin
Phe, F	Phenylalanin
Pro, P	Prolin
Sec, U	Selenocystein
Ser, S	Serin
Thr, T	Threonin
Trp, W	Tryptophan
Tyr, Y	Tyrosin
Val, V	Valin

**Nukleoside und Nukleotide**

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
dA	Desoxyadenosin
dC	Desoxycytidin
dG	Desoxyguanosin
dT	Desoxythymidin
dTMP	Desoxythymidinmonophosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat

# 1 Zusammenfassung

Infektionen mit Herpes-Simplex-Viren (HSV) verlaufen in einem Großteil der Fälle subklinisch oder führen zu harmlosen Erkrankungen der Haut und Schleimhäute. Allerdings können primäre und rekurrende Infektionen, insbesondere bei immungeschwächten Patienten, schwerwiegende und bedrohliche Krankheitsbilder auslösen. Goldstandard in der Therapie ist Aciclovir (ACV), ein Nukleosidanalogen. Resistenzen treten vor allem bei Patienten unter Immunsuppression auf, sodass bei klinischem Verdacht auf eine ACV-Resistenz eine schnelle diagnostische Abklärung für die adäquate Therapie unerlässlich ist. Konventionell erfolgt die Untersuchung durch die Bestimmung des viralen Phänotyps. Diese Methode hat sich in der Vergangenheit als sehr zuverlässig erwiesen, ist jedoch mit hohem Zeitaufwand verbunden. Deshalb wird die Labordiagnostik herpesviraler ACV-Resistenzen vermehrt mittels schnell realisierbarer genotypischer Analysen durchgeführt. Hierbei werden die Thymidinkinase (TK)- und DNA-Polymerase (Pol)-Gene sequenziert und im Vergleich zu einem ACV-sensitiven Referenzstamm bewertet. In 95% der Fälle sind Resistenzen gegenüber ACV durch Mutationen im viralen TK-Gen bedingt, während nur 5% der Fälle auf Veränderungen im DNA-Pol-Gen zurückzuführen sind. Problematisch ist vor allem das Auftreten neuer Aminosäure (AS)-Substitutionen, die bislang nicht in der Literatur beschrieben wurden, sodass durch genotypische Analyse keine Aussage über das Resistenzverhalten getroffen werden kann. Aus diesem Grund ist die Abklärung einer Resistenzassoziation neu aufgetretener Substitutionen in den TK- und Pol-Genen des HSV vermehrt Gegenstand aktueller Forschung.

Primäres Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb die Charakterisierung 20 literaturunbekannter oder bezüglich ihrer Resistenzassoziation unklarer AS-Substitutionen aus klinischen Stämmen des Herpes-simplex-Virus Typ 1 (HSV-1). Hierfür wurden ortsspezifische Mutagenese, Anzucht der Plasmide in *Escherichia coli* (*E. coli*), zellfreie Proteinexpression und Western Blot zur Kontrolle der synthetisierten Proteine durchgeführt. Die Bestimmung der Phosphorylierungsaktivität der rekombinanten TK-Proteine erfolgte mittels modifiziertem DiviTum<sup>TM</sup>-Assay, bei dem 5-Brom-2'-Desoxyuridin (BrdU) als Substrat eingesetzt wurde. Durch die Berechnung von Cut-off-Werten auf Basis von mitgeführten Kontrollen konnten die AS-Substitutionen als natürliche Genpolymorphismen (Q15K, R20C, R32H, E43A, E43D, R89H, A156V, P269S, G271V, S276N und I326V), Polymorphismen mit niedriger Phosphorylierungsaktivität (N244H, N376Stopp) oder Resistenz-assoziierte Mutationen (G61E, A93V, R163G, P173deletion, M121K, V238F, G264V) eingestuft werden. Um falsch positive Ergebnisse auszuschließen, wurde der Vektor pIX3.0 ohne TK-Gen-Insert als Nega-

tivkontrolle (NK) mitgeführt. Zusätzlich sollten vergleichend zwei Methoden implementiert werden, die sowohl ACV als auch Desoxythymidin (dT) als Substrat für die rekombinanten TK-Proteine verwendeten. Auf diese Weise konnten falsch positive Ergebnisse aufgrund veränderter Substratspezifität der Enzyme abgeklärt und die Möglichkeit geschaffen werden, widersprüchliche Ergebnisse aus DiviTum<sup>TM</sup>-Test und phänotypischen Analysen weiterführend zu analysieren. Dies gelang durch die Aufreinigung von in *E. coli* synthetisierten Proteinen aus Positivkontrolle (PK) und Resistenzkontrolle (RK), die anschließend in einem Phosphorylierungspuffer inkubierten, der ACV oder dT und Adenosintriphosphat (ATP) enthielt. Die Detektion von ACV und ACV-Monophosphat (MP) war mittels Flüssigchromatographie/Triple-Quadrupol-Tandemmassenspektrometrie (LC/MS/MS) nur eingeschränkt erfolgreich. Mit Hochleistungsflüssigkeitschromatographie/Ultravioletspektroskopie (HPLC/UV) konnte im Gegensatz dazu nicht nur der Gehalt an ACV und ACV-MP bzw. dT und Desoxythymidinmonophosphat (dTMP), sondern auch die Konzentration von ATP und Adenosindiphosphat (ADP) gemessen werden. Die Methode erlaubte somit die Unterscheidung zwischen Mutanten ohne Phosphorylierungsaktivität (TK<sup>-</sup>), mit reduzierter Phosphorylierungsaktivität (TK<sup>R</sup>) und veränderter Substratspezifität (TK<sup>A</sup>). Da sich dieses Verfahren sich als die sensitivere und zuverlässigere der beiden Methoden erwies, konnte exemplarisch die weiterführende Charakterisierung der AS-Substitutionen R32H (natürlicher Polymorphismus), N244H (TK<sup>A</sup>) und G264V (TK<sup>-</sup>) erfolgen.

Aus den vorliegenden Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass der DiviTum<sup>TM</sup>-Test für die Charakterisierung unklarer AS-Substitutionen im TK-Gen des HSV-1 sehr gut geeignet ist. Allerdings können in geringem Maße falsch positive Ergebnisse in Folge fehlender Substratspezifität auftreten. Als Alternative zur Analyse solcher Austausche ist die LC/MS/MS aufgrund der geringen Sensitivität und schlechten Reproduzierbarkeit weniger geeignet. Im Gegensatz dazu ist die HPLC/UV zur weiterführenden Testung unklarer Ergebnisse aus dem DiviTum<sup>TM</sup>-Assay zu empfehlen. Dieses Verfahren ist besonders zuverlässig, da aufgereinigte Proteine sowie ACV als Substrat der rekombinanten TK verwendet werden. Darüber hinaus können mit diesem Verfahren Aussagen über die Ursache der Resistenzentwicklung getroffen werden. Die in dieser Promotionsarbeit erzielten Ergebnisse liefern damit einen wichtigen Beitrag zum Verständnis des Genpolymorphismus der HSV-1-TK und können mit der zielgerichteten Analyse von fraglichen AS-Substitutionen die Resistenz-adaptierte antivirale Therapie von HSV-Infektionen weiter verbessern.

## 2 Einleitung

### 2.1 Humanpathogene Herpesviren

Die Familie der *Herpesviridae* gehört zur Ordnung der *Herpesvirales* und umfasst neben den Herpesviren, die Vögel, Reptilien und sogar Pilze befallen, auch die Herpesviren der Säugetiere und damit die humanpathogenen Herpesviren (Davison et al. 2009, King et al. 2012, Oxford und Öberg 1985). Die *Herpesviridae* werden durch die Herpesvirus Study Group des International Committee on the Taxonomy of Viruses (King et al. 2012) in drei Subfamilien eingeteilt:  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -*Herpesvirinae*, die sich in ihren biologischen Eigenschaften sowie in der Dauer des Replikationszyklus, in ihrer Wirtsspezifität und den Merkmalen einer latenten Infektion unterscheiden (Roizman 1982, Roizman und Baines 1991). Unter den etwa 100 bislang beschriebenen Vertretern der *Herpesviridae* ließen sich acht als menschenpathogen identifizieren, wobei der Mensch den einzigen Wirt darstellt (Wutzler und Sauerbrei 2009).

Zu den  $\alpha$ -*Herpesvirinae*, welche sich durch eine variable Wirtsspezifität, einen schnellen Reproduktionszyklus und damit durch eine schnelle Verbreitung in der Zellkultur auszeichnen, gehören das HSV sowie das Varicella-Zoster-Virus (VZV). Diese verbleiben nach der Primärinfektion latent in sensorischen Ganglien (Whitley und Roizman 2001, Wutzler und Sauerbrei 2009). Die  $\beta$ -*Herpesvirinae*, die sich in der Zellkultur nur langsam ausbreiten und eine eingeschränkte Wirtsspezifität zeigen, umfassen das Zytomegalievirus (CMV) sowie die Humanen Herpesviren 6 und 7 (HHV-6, -7). Deren Latenz findet in sekretorischem Nieren- und Drüsengewebe sowie in lymphoretikulären Zellen statt. Der Begriff „Zytomegalie“ wurde durch das Anschwellen von Zellen infolge der Infektion mit  $\beta$ -*Herpesvirinae* geprägt (Whitley und Roizman 2001, Wutzler und Sauerbrei 2009). Zudem stellt der Mensch den Wirt für die  $\gamma$ -*Herpesvirinae* Epstein-Barr-Virus (EBV) und Humanes Herpesvirus 8 (HHV-8) dar. Deren Replikationszyklus ist ähnlich dem der  $\beta$ -*Herpesvirinae* lang und ihr Wirtsspektrum ist eingeschränkt. Ihre Reproduktion sowie die Latenz finden meist spezifisch in T- und B-Zellen statt, weshalb sie als lymphotrop bezeichnet werden (Roizman und Baines 1991, Wutzler und Sauerbrei 2009, King et al. 2012,). Der Mensch kann sich aber auch mit tierischen Herpesviren, wie dem für Rhesusaffen pathogenen Herpesvirus B (*Herpesvirus simiae*, Cercopithecines Herpesvirus 1) infizieren. Dies kann zu gefährlichen Komplikationen in Form von Enzephalomyelitiden mit schwerer neurologischer Symptomatik führen (Huff und Barry 2003).

## 2.2 Herpes-simplex-Virus

Beim HSV werden zwei Serotypen unterschieden: HSV-1 und Herpes-Simplex-Virus Typ 2 (HSV-2), deren Genome sich nur unwesentlich voneinander unterscheiden. Bei 73 von 74 Genen sind 67 bis 97 Prozent (%) der Basensequenzen identisch (Schneweis 2001). Nur das diagnostisch wichtige Hüllglykoprotein (g) G von HSV-2 besitzt etwa 500 AS, die beim HSV-1 fehlen. Ein wichtiges klinisches Unterscheidungskriterium der beiden Virustypen ist deshalb die Lokalisation der typischen ulzerierenden Bläschen, die von den Viren verursacht werden: Herpes-Simplex-Virus Typ 1 führt meist zu Infektionen im orofazialen Bereich, während HSV-2 vorwiegend den Herpes genitalis auslöst (Schneweis 2001).

## 2.3 Geschichtlicher Hintergrund

Mehr als 25 Jahrhunderte lang wurde der Begriff „Herpes“ für diverse Hautkrankheiten verwendet, doch die Bedeutung der Bezeichnung hat sich im Lauf der Jahre stark eingeschränkt (Roizman 1982). Bereits im antiken Griechenland wurden die ersten Infektionen durch HSV beschrieben. Griechische Gelehrte, unter denen der bekannteste wohl Hippocrates ist, prägten den Begriff „Herpes“ (Beswick 1962, Wildy 1973). Dieser stammt vom altgriechischen Wort „ἑρπεῖν“ (herpein) ab, was übersetzt so viel wie „kriechen“ oder „schleichen“ bedeutet und auf die Ausbreitung des Virus im Körper hinweist. Er bezieht sich aber ebenso auf die herpess-typischen Hautläsionen nach Ausbruch der Infektion (Whitley und Roizman 2001). Beschreibungen des Lippenherpes finden sich schon im Jahr 100 v. Chr. bei dem römischen Arzt Herodotus, der von herpetischen Erosionen im Mundbereich während einer Fieberepisode berichtet. 1664 beschrieb der französische Arzt Astruc erste Hinweise auf genitale Herpesvirus-Infektionen, wohingegen die Übertragungsweise des Virus von Mensch zu Mensch erst über 200 Jahre später durch Vidal erkannt wurde (Wildy 1973). Die erste Herpeskeratitis beschrieb Grüter 1913 und schon sieben Jahre später berichtete Doerr von einer Enzephalitis, die nach einer kornealen Herpesvirus-Infektion aufgetreten war. Im Jahr 1957 konnte Huang erstmalig Hinweise auf serologische Unterschiede zwischen den Erregern des Lippen- und des genitalen Herpes finden, woraus er auf das Vorkommen zweier verschiedener HSV-Typen schloss. Deren Existenz konnten Nahmias und Schneweis Ende der sechziger Jahre des zwanzigsten Jahrhunderts endgültig beweisen, indem sie die verschiedenen antigenen Eigenschaften von HSV-1 und -2 nachwiesen (Oxford und Öberg 1985).

## 2.4 Virusgenom

Die Desoxyribonukleinsäure (DNA) des HSV liegt als lineare, doppelsträngige (ds)-DNA vor und besteht aus etwa 152.000 Basenpaaren (bp) mit einem Molekulargewicht zwischen  $68 \times 10^3$  und  $100 \times 10^3$  Kilodalton (kDa). Das Genom wurde bereits komplett sequenziert (McGeoch et al. 1985) und enthält ca. 70 Open Reading Frames (ORF) (Kieff et al. 1971, Mattison et al. 1991, Modrow et al. 2003).



Abb. 1: Genomorganisation des HSV (modifiziert nach Aghi und Martuza 2005).

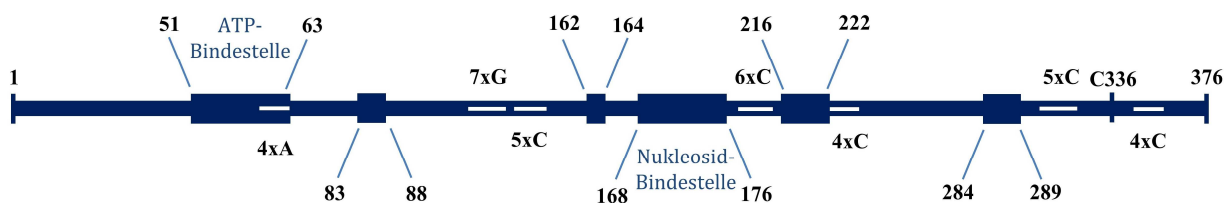
Unterteilt wird das Genom in ein langes Segment, das 82% der Basenpaare ausmacht, und in ein kurzes Segment, welches 18% beinhaltet. Das lange Segment kodiert für 58 Gene, während das kurze 13 enthält. Beide besitzen Abschnitte einheitlicher Sequenzfolgen, welche im langen Segment als Unique Long ( $U_L$ )-Region und im kurzen als Unique Short ( $U_S$ )-Region bezeichnet werden. Diese sind durch relativ kurze, invertierte und repetitive Sequenzen begrenzt, welche bei Flankierung der  $U_L$ -Region als a- und b-Element sowie bei Flankierung der  $U_S$ -Region als a- und c-Element bezeichnet werden. Je nach Lage im Zentrum oder am Ende des Genoms werden diese als Internal Repeat (IR) oder Terminal Repeat (TR) bezeichnet (Ward und Roizman 1994, Modrow et al. 2003, McGeoch et al. 2006). Dieser Aufbau ist schematisch in Abbildung (Abb.) 1 dargestellt.

Die TRs der  $U_L$ -Region beinhalten mehrere sich wiederholende a-Abschnitte, welche aus 465 bis 624 bp bestehen. Es folgt ein b-Element aus 8.800 bp. Beide Abschnitte gemeinsam werden als Terminal Repeat, Long Segment ( $TR_L$ ) bezeichnet. Es schließt sich die  $U_L$ -Region an, auf die die IRs des langen Segments ( $IR_L$ ) folgen. Diese bestehen aus einem inversen b'-Element und einer unterschiedlichen Anzahl an Wiederholungen des a'-Abschnitts. Gemeinsam mit den IR des kurzen Segments ( $IR_S$ ), welche aus einem c'-Element mit 6.600 bp und weiteren a'-Elementen bestehen, bilden diese die IR-Region. Es folgt die  $U_S$ -Region, welche zum Ende des Genoms hin durch einen c-Abschnitt sowie mehrere a-Sequenzen begrenzt wird. Diese bilden den Terminal Repeat, Short Segment ( $TR_S$ ) (Whitley und Roizman 2001, Modrow et al. 2003). Durch intramolekulare Rekombination der identischen invertierten Ele-

mente während der Replikation des Virus können vier isomere Genprodukte entstehen. In diesen sind die  $U_L$ - und  $U_S$ -Einheiten unterschiedlich zueinander orientiert. Die Genprodukte unterscheiden sich nur in der Orientierung dieser Regionen und nicht in ihrem Informationsgehalt. Alle vier liegen in äquimolarer Konzentration (c) in jedem Virion vor (Modrow et al. 2003, McGeoch et al. 2006). Wie in Abb. 1 (Seite (S.) 5) zu erkennen, enthält das Genom des HSV drei Origins of Replication (ori), die als Ausgangsorte für die DNA-Synthese dienen. Diese werden nach ihrer Lage im langen Segment (oriL) oder im kurzen Segment (oriS) benannt. Da oriS in einer repetitiven Sequenz liegt, ist es doppelt vorhanden. Entweder oriL oder eines der oriS sind essentiell für die Virusreplikation (Taylor et al. 2002, Modrow et al. 2003, Balliet et al. 2005). Die viralen Proteine werden nach der Reihenfolge ihrer Kodierung im Genom mit  $U_L1$ ,  $U_L2$  bzw.  $U_S1$ ,  $U_S2$  usw. bezeichnet (Taylor et al. 2002).

### ➤ Thymidinkinase-Gen

Für die TK kodiert die 1131 Nukleotide (nt) lange  $U_L23$ -Region. Charakteristisch für das TK-Gen von HSV-1 sind die vielen homopolymeren Regionen, sogenannte HotSpots (Sasadeusz et al. 1997), die meist aus Guanin oder Cytosin bestehen. Das TK-Gen weist zudem einen ungewöhnlich stark ausgeprägten natürlichen Polymorphismus auf (Kit et al. 1983, Bohn et al. 2011). Die HSV-1-TK besitzt sechs hochkonservierte Regionen, die in Abb. 2 dargestellt sind. Von diesen sind die ATP- und die Nukleosid-Bindestelle (NBS) im aktiven Zentrum am wichtigsten für die Enzymaktivität. Außerdem essentiell für die Aktivität der TK ist ein Cystein (C, Cys) an Codon 336, das die dreidimensionale Struktur der katalytischen Region aufrecht erhält (Graham et al. 1986, Folkers et al. 1989, Evans et al. 1998).

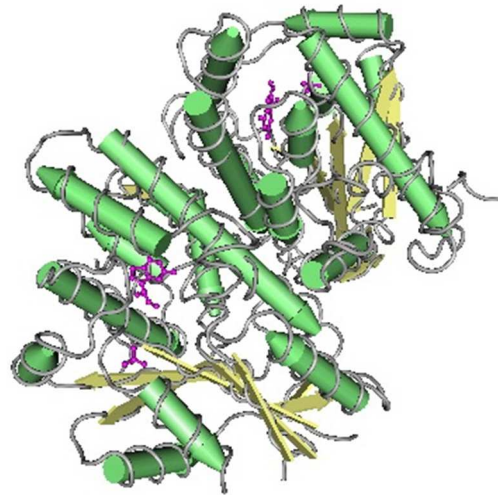


**Abb. 2: Struktur der TK des HSV-1.**

Konservierte und aktive Regionen sind in Boxen dargestellt, homopolymere HotSpots als weiße Striche. Die Zahlen geben die Codons der jeweiligen Regionen an (modifiziert nach Gilbert et al. 2002).

Das TK-Protein ist 376 AS lang und liegt als Homodimer im Komplex mit vier Wassermolekülen vor (Wild et al. 1997). Es besteht, wie in Abb. 3 (S. 7) dargestellt, aus fünf  $\beta$ -Faltblättern und zwölf  $\alpha$ -Helices (Brown et al. 1995).





**Abb. 3: Struktur des HSV-1-TK-Dimers (Stránská 2004).**

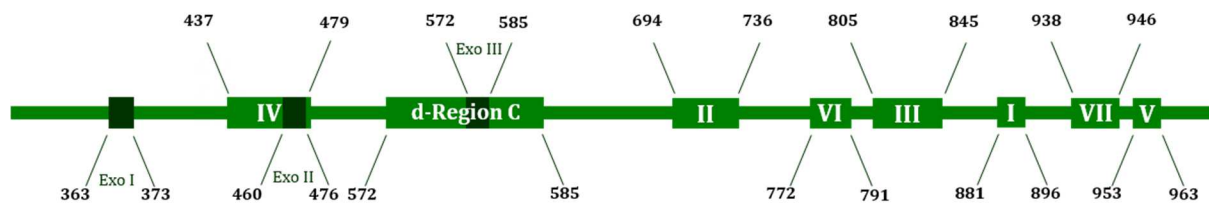
Das Rückgrat des Proteins aus  $\alpha$ -Helices (grün) und  $\beta$ -Faltblättern (gelb) sowie die Substrate ACV und Phosphat (violett) sind zu erkennen.

Die herpesvirale TK ist eine Desoxypyrimidinkinase, die in die Biosynthese von dTMP involviert ist. Sie katalysiert den Transfer der  $\gamma$ -Phosphatgruppen von ATP auf die 5'-OH-Gruppe des dT, welches ihr natürliches Substrat ist. Dennoch weißt sie ein breites Spektrum an Substraten auf, sodass sie auch die Phosphorylierung von Purin- und Pyrimidinnukleosiden oder Purinnukleosidanaloga wie ACV vermittelt (Jamieson und Subak-Sharpe 1974, Evans et al. 1998, Pilger et al. 1999) .

### ➤ DNA-Polymerase-Gen

Die DNA-Pol Pol, U<sub>L</sub>30, besteht aus 1235 AS und weißt DNA-abhängige DNA-Polymerase-, 5'-3'-Exonuclease/RNaseH- (Crute und Lehman 1989) und 5'-3'-Exonuclease-Aktivität (Knopf 1979) auf. Das Protein liegt als Heterodimer mit dem Genprodukt aus U<sub>L</sub>42, einem Phosphoprotein mit dsDNA-bindender Aktivität, vor. Dieses ist ebenso wie die DNA-Pol für die virale Replikation essentiell (Hernandez und Lehman 1990). Die Pol liegt als Enzym in Form einer Hand vor und besitzt, wie in Abb. 4 (S. 8) zu sehen, acht konservierte Genregionen, die je nach Stärke ihrer Konserviertheit von I bis VIII nummeriert sind. Zusätzlich beinhaltet die Exonuclease-Domäne der Pol drei konservierte Regionen (Exo I, II, III) (Piret und Boivin 2011). Die am stärksten konservierte Region I, ein Teil der Finger-Domäne, ist betei-

ligt an der Bindung von Desoxyribonukleotidtriphosphaten (dNTPs) und somit essentiell für die Aktivität der DNA-Pol (Bernad et al. 1990, Marcy et al. 1990).

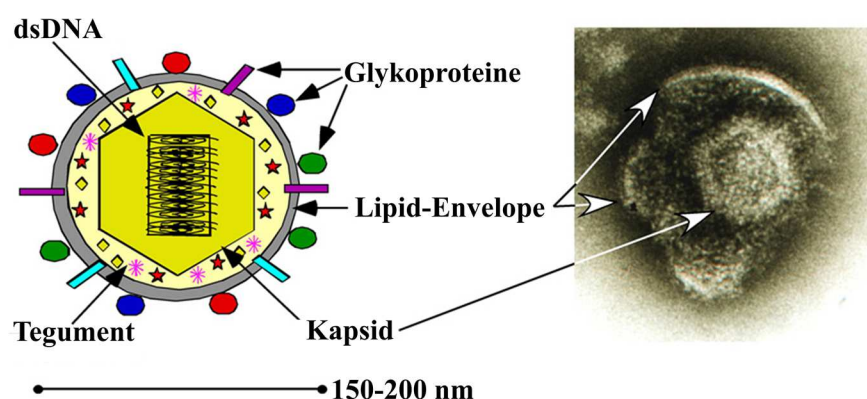


**Abb. 4: Struktur der DNA-Pol des HSV-1.**

Konservierte Regionen sind durch hellgrüne Boxen dargestellt, konservierte Bereiche in der Exonuclease-Domäne durch dunkelgrüne. Zahlen unter- bzw. oberhalb der Leiste geben die entsprechenden Codons an (modifiziert nach Gilbert et al. 2002).

## 2.5 Virusmorphologie

Der Durchmesser der HSV-Partikel, welche aus mehr als 30 Strukturproteinen bestehen, liegt bei 150 bis 200 nm. Im Inneren ist das Virus-Core zu finden, eine fibrilläre Proteinmatrix, in welcher die spulenförmig angeordnete DNA liegt. Das Core ist von einem ikosaedrischen Nukleokapsid mit einem Durchmesser von 100 nm umgeben. Dieses besteht aus mehreren Virusstrukturproteinen, den Kapsomeren. Der Durchmesser von 100 nm und die 162 Kapsomere sind charakteristisch für alle Herpesviren. Ein Kapsomer wird aus sechs Hauptkapsidproteinen gebildet. Diese sind über Disulfidbrücken mit weiteren Virusproteinen verbunden, die ihrerseits mit der DNA assoziiert sind (Mattison et al. 1991, Modrow et al. 2003, McGeoch et al. 2006).



**Abb. 5: Aufbau des HSV (modifiziert nach Taylor et al. 2002).**  
Links als Schema, rechts im elektronenmikroskopischen Bild.

Das Nukleokapsid wird von einem Tegument umgeben, in welchem bis zu 20 für die Replikation wichtige Proteine, wie zum Beispiel der  $\alpha$ -Trans-Inducing-Factor (TIF) und das Protein Virion-Host-Shutoff (VHS), enthalten sind. Zuäüßerst findet sich ein Envelope aus Lipiden, was zur Folge hat, dass das HSV für lipophile Lösungsmittel anfällig ist. Diese Hülle bildet sich bei der Knospung des Virus aus wirtszelleigenem Material und hat 600 bis 750 virale Spikes sowie nichtglykosilierte Polypeptide von variabler Länge eingelagert. Die Oberflächenproteine nehmen eine wichtige Stellung bei der Adsorption an die Wirtszelle, der Penetration und der Induktion einer Antikörper (AK)-Antwort ein (Whitley et al. 1998, Grünewald et al. 2003, Modrow et al. 2003, Darai 2009). Abbildung 5 (S. 8) zeigt den Aufbau der HSV-Partikel.

## **2.6 Epidemiologie und Übertragung**

Epidemiologische Untersuchungen zum HSV bringen häufig Probleme mit sich, wie beispielsweise die hohe Anzahl an subklinischen Infektionen, die Unterscheidung von primären und rekurrenden Infektionen, Koinfektionen mit beiden Serotypen sowie die Infektion mit verschiedenen Stämmen in der latenten Phase (Oxford und Öberg 1985). Infektionen mit HSV sind weltweit sowohl in Industrie- als auch in Entwicklungsländern verbreitet. Die Durchseuchungsrate hängt von Alter, Geschlecht, Ethnie, geographischer Region und sozioökonomischem Status ab (Whitley 1982, Fatahzadeh und Schwartz 2007,).

Weltweit steigt die Seroprävalenz des HSV-1 mit zunehmendem Alter. Die Durchseuchungsrate bei Erwachsenen erreicht in Deutschland bis zu 90% (Wutzler et al. 2000, Pebody et al. 2004). Studien zeigen zudem eine Prävalenz von Anti-HSV-2-IgG von etwa 14% in Deutschland, während diese Werte in Entwicklungsländern deutlich höher liegen. So konnten in Teilen Afrikas HSV-2-Infektionen bei über 80% der Bevölkerung nachgewiesen werden (Weiss et al. 2001, Pebody et al. 2004). Die Übertragung von HSV-1 erfolgt meist schon im frühen Kindesalter über direkten Kontakt mit virushaltigem Bläscheninhalt und Sekreten der Mundhöhle, sodass bereits 50% der Fünfjährigen mit HSV infiziert sind. Auch asymptomatische Virusträger können zur Verbreitung des Virus beitragen. Der erste Kontakt mit dem Virus verläuft in der Regel ohne oder mit nur milder klinischer Symptomatik (Warrell 1990, Wutzler und Sauerbrei 2009, Schiffer und Corey 2010). Infektionen mit HSV-2 sind sexuell übertragbare Krankheiten und treten deshalb meist erst nach der Pubertät durch die Übertragung

von Genitalsekreten bei sexuellem Kontakt auf. Das Virus kann zudem perinatal übertragen werden (Warrell 1990, Modrow et al. 2003, Wutzler und Sauerbrei 2009).

## 2.7 Pathogenese und Replikation

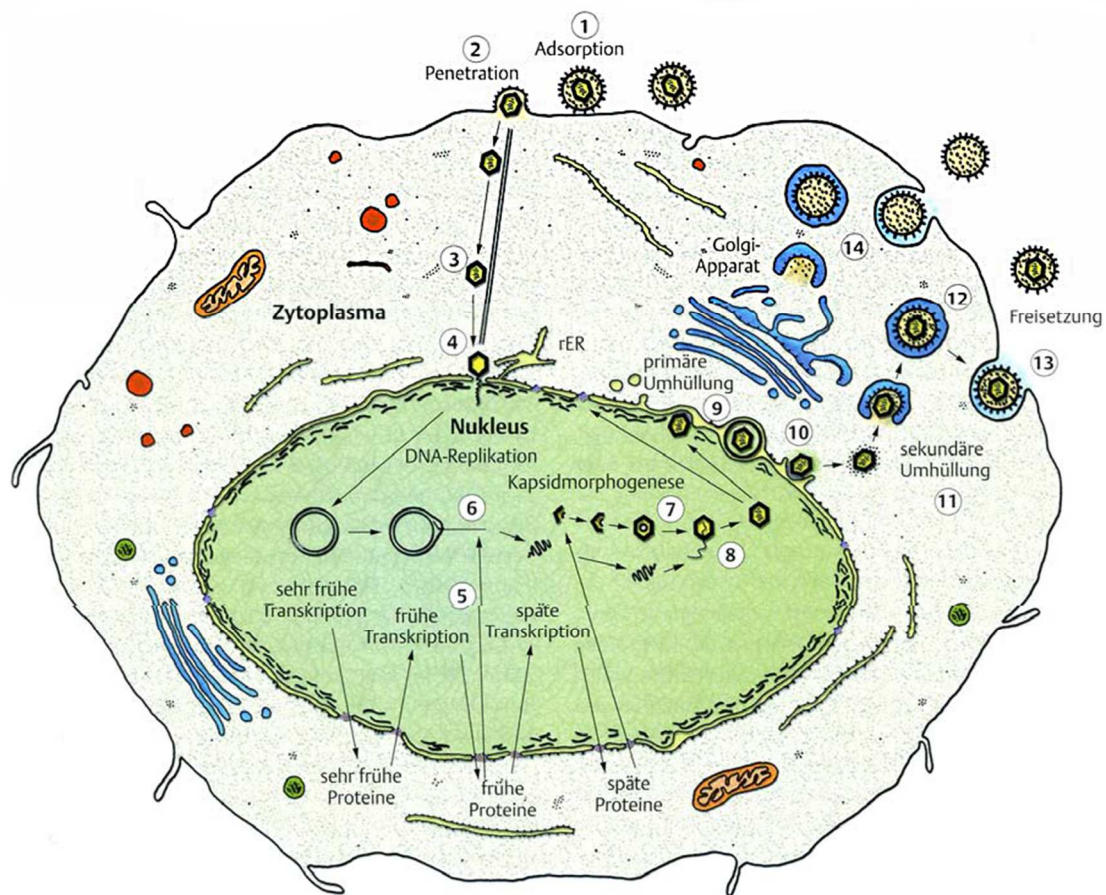
Hinsichtlich seines Tropismus ist das HSV als pantrop und fakultativ neurotrop einzustufen, es befällt aber bevorzugt Haut und Schleimhäute. Eine Erkrankung kann sowohl bei Primärinfektion als auch nach Reaktivierung des in den Ganglienzellen persistierenden Virus ausbrechen. Prinzipiell wird der Replikationszyklus des Virus in einen lytischen und einen latenten unterteilt (Jenkins und Turner 1996, Roche Lexikon Medizin 1998, Pschyrembel Klinisches Wörterbuch 2014).

### ➤ Lytischer Replikationszyklus

Der lytische Replikationszyklus des HSV ist in Abb. 6 (S. 11) in den Schritten (1) – (14) dargestellt. Bei Erstkontakt mit dem Virus kommt es zur Infektion der Epithelzellen und Keratinozyten sowie der regionalen Lymphknoten (Modrow et al. 2003). Für den Zelleintritt spielen die viralen g eine wichtige Rolle. Auf die initiale Bindung von viralem gC oder gB an Heparansulfat folgt zur Stabilisierung der Adsorption die Interaktion von gD mit weiteren zellulären Oberflächenfaktoren, wie dem Tumor-Nekrose-Faktor oder Proteinen der Immunglobulin (Ig)-Superfamilie (1). Diese werden als Herpes-Virus-Entry-Proteine bezeichnet. Bei der anschließenden Fusion der Virushülle mit der Membran der Wirtszelle spielen gB, gD, gH und gL eine wichtige Rolle (2) (Ojala et al. 2000, Spear et al. 2000, Shukla und Spear 2001, Whitley und Roizman 2001, Akhtar und Shukla 2009).

Des Weiteren können Herpesviren auch Zellen infizieren, die die genannten Rezeptoren nicht besitzen. Zum einen wurde für einigen Zelltypen eine endozytotische Aufnahme und pH-abhängige Freisetzung der Kapside nachgewiesen (Nicola et al. 2003, Clement et al. 2006). Andererseits können auch die Zellmembranen infizierter und nicht infizierter Wirtszellen miteinander verschmelzen, sodass die Kapside des Virus von Zelle zu Zelle weitergegeben werden. An diesem Vorgang ist vermutlich ein Komplex aus gE und gI beteiligt (Dingwell und Johnson 1998, Reske et al. 2007). Nach der Fusion der Hüllmembranen werden das virale Nukleokapsid und Tegumentproteine in die Zelle freigesetzt und via Mikrotubuli in den Nukleolus transportiert (3), (4). Proteine, die nicht über Kerntransportsignale verfügen, verbleiben im Zytoplasma (Sodeik et al. 1997, Modrow et al. 2003). Nach der Translokation des Nukleo-

kapsids in den Zellkern kommt es zur Zirkularisierung des zuvor linear vorliegenden Genoms, sodass das Episom entsteht (Whitley et al. 1998, Modrow et al. 2003). Es folgt die kaskadenartig regulierte Proteinsynthese, wobei zuerst Immediate Early (IE)- und später Early (E)- sowie Late (L)-Gene transkribiert und translatiert werden (5) (Weir 2001).



**Abb. 6: Lytischer Replikationszyklus des HSV (Doerr und Gerlich 2009).**

Die frühen Gene kodieren für Proteine zur Replikation des Virus, während die späten Proteine Strukturelemente darstellen. Im Anfangsstadium wird die Proteinexpression durch die Transaktivatoren TIF und pp71 initiiert, die an die Promotoren der IE-Proteine binden und so die zelluläre Ribonukleinsäure (RNA)-Pol II aktivieren. Hierdurch wird messengerRNA (mRNA) synthetisiert, die in den Zellkern transportiert wird und dort die Promotoren der E-Proteine mobilisiert. So entstehen für die Virusreplikation essentielle Enzyme und Polypeptide wie beispielsweise die TK oder die DNA-Pol (Whitley et al. 1998, Taylor et al. 2002, Modrow et al. 2003, Mettenleiter 2004). Zusätzlich verhindern die E- und IE-Proteine die Replikation von Wirtszell-DNA (Roizman und Tognon 1983). Hierfür ist einerseits das VHS-Protein ver-

antwortlich, welches zur Degradierung von Wirtszell-mRNA führt (Kwong et al. 1988), andererseits ist an diesem Vorgang auch das IE-Protein ICP27 beteiligt, welches das Spleißen von zellulären mRNAs beeinträchtigt (Hardwicke und Sandri-Goldin 1994). Zudem werden durch die Infektion zelluläre Enzyme gehemmt, die für die Regulation des Zellzyklus zuständig sind (Everett et al. 1999).

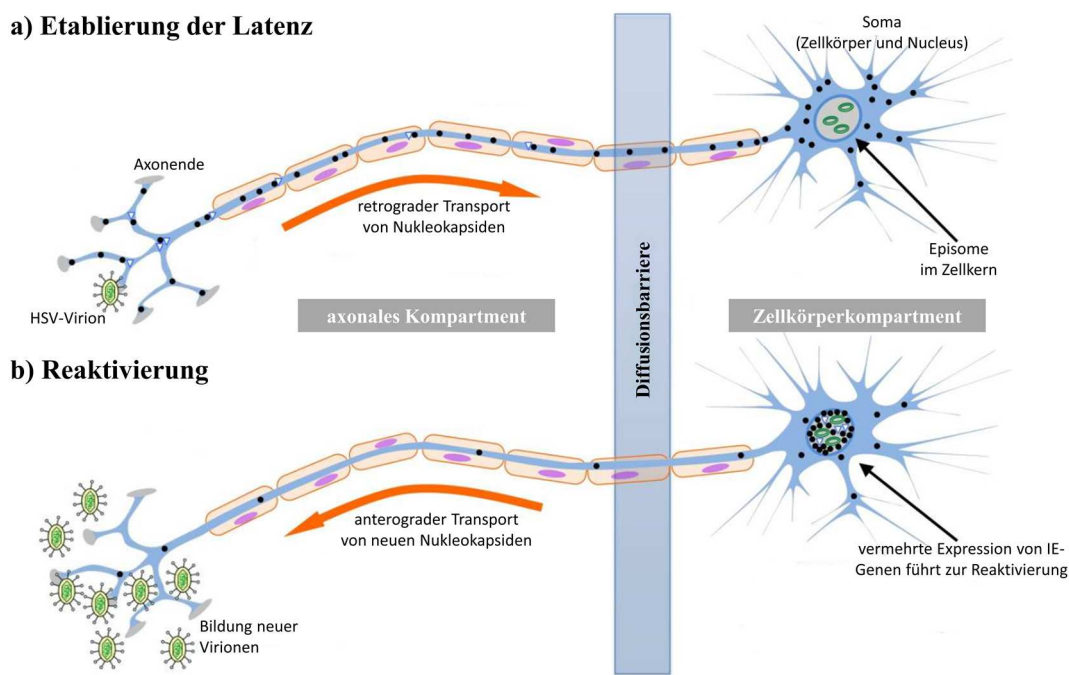
Die Replikation der viralen DNA findet nach dem Prinzip des rolling circle statt **(6)**. Hierbei wirken die Enzyme DNA-Pol, Helikase und Primase bei der Verlängerung des 3'-Endes eines geschnittenen DNA-Stranges mit, der später durch Okazaki-Fragmente und RNA-Primer zum Doppelstrang ergänzt wird (Boehmer und Lehman 1997, Modrow et al. 2003). Parallel zur DNA-Replikation werden die L-Proteine synthetisiert. Diese beinhalten die verschiedenen g sowie weitere Strukturproteine. An der Zelloberfläche nutzt das humorale Immunsystem in die Plasmamembran eingelagerte g als Antigene (AG), sodass infizierte Zellen erkannt und phagozytiert werden können (Modrow et al. 2003, Wutzler und Sauerbrei 2009). Zeitgleich werden die Tegument- und Kapsidproteine in das Kernplasma transportiert, um gemeinsam mit scaffolding-Proteinen leere Prokapside zu bilden **(7)**. Die scaffolding-Proteine gehen verloren, wenn die konkatemere DNA in jeweils gleich langen Molekülen in die Kapside gepackt wird **(8)** (Modrow et al. 2003, Thurlow et al. 2006). Die Tegumentproteine interagieren nun mit den DNA-haltigen Kapsiden und die Partikel assoziieren mit der inneren Kernmembran, sodass die neu gebildeten Viren durch Knospung in den perinukleären Raum freigesetzt werden **(9)**. Die hierbei entstehende primäre Hülle geht beim Durchtritt durch die äußere Kernmembran verloren, sodass unbehüllte Kapside in das Zytoplasma geschleust werden **(10)**. Im Folgenden kommt es zur Bildung einer sekundären Behüllung durch Transportvesikel aus dem Golgi-Apparat, in die virale Hüllproteine eingelagert sind **(11)**, **(12)**. Durch Fusion der sekundären Hülle mit der Plasmamembran werden nun infektiöse Viren freigesetzt **(13)**, wobei es zur Lyse der Wirtszelle kommt (Modrow et al. 2003, Mettenleiter 2004, Rémillard-Labrosse et al. 2006, Mettenleiter et al. 2009, Wutzler und Sauerbrei 2009, Baines 2011, Henaff et al. 2012). Außerdem werden nicht infektiöse Partikel, sogenannte light-Partikel, gebildet, die kein Nukleokapsid enthalten **(14)** (McLauchlan und Rixon 1992).

### ➤ Latenz

Herpesviren besitzen die besondere Fähigkeit, nach der Primärinfektion eine Latenz in sensorischen Ganglienzellen zu manifestieren. Das HSV-1 verbleibt vorwiegend im Ganglion tri-



geminale, während das HSV-2 die Sakralganglien befällt (Roizman und Knipe 2001, Taylor et al. 2002). Hierfür wandern die Viren über infizierte Epithelzellen zu sensiblen Nervenendigungen, woraufhin das virale Nukleokapsid retrograd entlang von Axonen in die Kerne sensorischer Neuronen transportiert wird und dort lebenslang verbleiben kann. Verantwortlich für die Wanderung ist ein Komplex aus gE und gI (Dingwell und Johnson 1998). Dieses Stadium wird Latenz genannt, da das Virusgenom in den Ganglien nicht vollständig transkribiert wird, sodass keine infektiösen Partikel gebildet werden. Bei der wirtszelleigenen Replikation wird das Virusgenom aber durch die zelluläre DNA-Pol vermehrt und an Tochterzellen weitergegeben. Die herpesvirale DNA liegt in den Ganglienzellen als extrachromosomales Episom vor, wobei pro Zelle zehn bis 100 Episome zu finden sind (Taylor et al. 2002, Modrow et al. 2003). Die Etablierung der Latenz ist in Abb. 7a schematisch dargestellt.



**Abb. 7: Latenz (a) und Virusreaktivierung (b) (modifiziert nach Wilson und Mohr 2012).**

Die Genexpression im Latenzstadium unterscheidet sich grundlegend von der im lytischen Replikationszyklus. Es kommt zur Transkription von Latenz-assoziierten Transkripten (LATs). Dabei handelt es sich um nicht kodierende RNAs, die als Vorläufer von microRNAs (miRNAs) fungieren. Diese halten die Latenz aufrecht, unterdrücken die Transkription von Genen des lytischen Lebenszyklus und vermitteln anti-apoptotische Wirkung für die infizierte Ganglienzelle (Kang et al. 2003, Umbach et al. 2008). Allerdings zeigt eine aktuelle Studie (Ma et al. 2014), dass in etwa der Hälfte der Zellen, in denen eine herpesvirale Latenz vor-

liegt, auch Proteine des lytischen Zyklus synthetisiert werden. Die Bedeutung dieser Genprodukte in der Latenz ist noch unklar. Zudem kommt es in der latenten Phase zur Produktion viraler Proteine, die auf der Zelloberfläche als AG präsentiert werden. Somit werden infizierte Zellen maskiert und vom Immunsystem nicht als körperfremd erkannt (Vider-Shalit et al. 2007).

### ➤ Endogene Reaktivierung

Liegt das HSV nach der Primärinfektion in der latenten Phase vor, kommt es bei 15-30% (HSV-1) bzw. bei bis zu 60% (HSV-2) der Infizierten zu Rezidiven (Adam et al. 1979, Wutzler und Sauerbrei 2009). Diese können durch eine Vielzahl an endo- und exogenen Stimuli ausgelöst werden, die in den Neuronen zu einer Prostaglandin-Synthese führen und damit freie Radikale erzeugen (Schneweis 2001). Beispiele hierfür sind physischer und psychischer Stress, Einwirkung von ultravioletter Strahlung, Immunsuppression, Traumata oder Nervenreizung z.B. durch Operationen, die Anwendung verschiedener Medikamente wie Epinephrin oder Dexamethason sowie fieberhafte Infekte und körpereigene Hormone (Whitley et al. 1998, Schneweis 2001, Wutzler und Sauerbrei 2009, Grinde 2013). Wie in Abb. 7b (S. 13) dargestellt, führt eine Reaktivierung zum anterograden Transport der viralen Nukleokapside entlang der Axone und somit zur erneuten Produktion infektiöser Partikel im lytischen Replikationszyklus. Hierdurch können klinische Symptome in den von dem betroffenen Nerv innervierten Bereichen entstehen, d.h. es kommt zur Rekrudeszenz. Die Virusreaktivierung kann aber auch mit einer symptomlosen Virusausscheidung, der asymptomatischen Rekurrenz, einhergehen. (Schneweis 2001, Gärtner und Müller-Lantzsch 2002, Suttorp et al. 2004).

## 2.8 Klinik der Herpes-simplex-Virus-Infektionen

Obwohl HSV-1 hauptsächlich den Herpes labialis und HSV-2 den Herpes genitalis bedingt, werden etwa 17% (mit steigender Tendenz) der primär genitalen Herpesinfektionen durch HSV-1 hervorgerufen (Lafferty et al. 2000). Die Primärinfektion mit HSV-1 führt in nur 1% der Fälle zu Symptomen und äußert sich nach einer Inkubationszeit von drei bis sieben Tagen meist als Gingivostomatitis oder Pharyngitis, wobei sich schmerzhaft, ulzerierende Bläschen in Mund und Rachen bilden (Abb. 8, S. 15). Begleitend treten oft grippeähnliche Symptome wie Fieber, Gliederschmerzen oder Unwohlsein auf. Lokale Rezidive erreichen in der Regel nicht die Ausdehnung und Schleimhautschädigung der Primärinfektion, sondern verbleiben



extraoral als Herpes labialis (Abb. 8) und seltener als Herpes facialis. Ausnahmen hierbei sind Herpeskeratitiden, die eine deutlich schlechtere Prognose haben und zur Beeinträchtigung des Sehvermögens bis zur Erblindung führen können (Warrell 1990, Chayavichitsilp et al. 2009, Wutzler und Sauerbrei 2009).



**Abb. 8: Klinische Manifestationen des HSV-1 (Fatahzadeh und Schwartz 2007).**

Von links nach rechts: primäre Gingivostomatitis herpetica, reaktiver Herpes labialis, rezidierender Herpes bei Immundefizienz.

Die größte Infektionsquelle des HSV-2 sind inapparente genitale Infektionen. Bei Rezidiven ist oftmals nicht nur das Genitale betroffen, zum Teil weisen auch die Oberschenkelhaut und der untere Stamm (Herpes integumentalis) die typische schmerzhaften Bläschenbildung auf. In seltenen Fällen können sowohl Primär- als auch rezidierende Infektionen durch virämische Streuung zu einer benignen Meningitis führen (Schneweis 2001, Wutzler und Sauerbrei 2009). Zudem kann HSV-2 und seltener auch HSV-1 von einer Schwangeren auf das Kind übertragen werden. Sehr selten erfolgt die Infektion diaplazentar und verursacht Spontanaborte oder Embryofetopathien (Mattison et al. 1991, Jones 1996). Häufiger entsteht Herpes neonatorum bei der Übertragung von HSV-2 während des Geburtsvorganges (intrapartal) oder bei Ruptur der Fruchtblase, wenn die Schwangere primärinfiziert ist. Deshalb wird bei genitaler HSV-Infektion mittels primärer Sectio caesarea entbunden (Brown et al. 1991, Wutzler und Sauerbrei 2009). Bei einer Erkrankung des Neugeborenen kann durch adäquate antivirale Therapie die Mortalität bei Manifestation im zentralen Nervensystem (ZNS) von 90% auf 12% gesenkt werden. Kommt es zu disseminierten Krankheitsverläufen, bei denen eine lymphohämatogene Streuung in diverse innere Organe stattfindet, sterben trotz Therapie ca. 50% der Betroffenen (Schneweis 2001). Überlebende Kinder tragen in bis zu 44% der Fälle bleibende neurologische Schäden davon (Schneweis 2001, Wutzler und Sauerbrei 2009).

Die Herpesenzephalitis bei Kindern und Erwachsenen ist die gravierendste Erkrankung durch HSV. Sie befällt zuerst das limbische System und breitet sich dann auf frontomediobasale und

temporale Gehirnbereiche aus. Die hämorrhagisch-nekrotisierende Entzündung erreicht unbehandelt eine Letalität von mehr als 50% und hinterlässt schwere bleibende Hirnschäden. In einem Drittel der Fälle ist die HSV-Enzephalitis Manifestation einer Primärinfektion, den Rest der Fälle machen endogene Rezidive aus. Ob das Virus über den Nervus olfactorius oder direkt vom Ganglion trigeminale in das Gehirn gelangt, ist bislang ungeklärt (Schneweis 2001, Wutzler und Sauerbrei 2009).

Zudem ist die Entstehung eines generalisierten Eczema herpeticum auf Basis eines endogenen Ekzems möglich (Wutzler und Sauerbrei 2009). Hierbei umgeht das Virus die Nervenendigungen und breitet sich direkt auf vorgeschädigte Hautareale aus, wie sie z.B. bei atopischer Dermatitis vorliegen. Nach einem akuten Beginn der Entzündung zeigen sich großflächig ulzerierende Bläschen und Erosionen. Typische Begleitsymptome sind Fieber und allgemeines Unwohlsein. Eine gefürchtete Komplikation ist die bakterielle Superinfektion der betroffenen Areale (Marcus et al. 2005, Fatahzadeh und Schwartz 2007).

Generalisierte Infektionen wie beim Neugeborenen treten bei immunkompetenten Personen nur sehr selten auf. Bei Patienten mit defizienter Immunabwehr z.B. durch das Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) oder eine medikamentöse Immunsuppression kann es zu langwierigen Krankheitsprozessen kommen. Hier sind die Läsionen, wie in Abb. 8 (S. 15) zu erkennen, im Vergleich zum Gesunden stärker ausgeprägt (Schneweis 2001, Wutzler und Sauerbrei 2009). Dabei scheint ein direkter Zusammenhang zwischen Dauer sowie Stärke der Immunsuppression und der Schwere der Erkrankung zu bestehen (Fatahzadeh und Schwartz 2007). Außerdem treten bei immunsupprimierten Personen häufiger Rekrudeszenzen auf als bei Immungesunden. Dies wird durch das 80%ige Risiko eines HSV-Rezidivs nach Knochenmarktransplantation, sofern keine Chemoprophylaxe erfolgt, verdeutlicht (Sandherr et al. 2006). Die fehlende Viruselimination verursacht eine schlechte Abheilung der Läsionen und lokale Progredienzen. Durch die Ausbreitung kann es zum viszeralem Herpes, dem Befall innerer Organe, kommen. Dies resultiert in Ösophagitiden, Hepatitiden, Pneumonien, Enzephalitiden, nekrotisierenden Retinitiden und chronischen Mukosiden (Whitley et al. 1998, Schneweis 2001, Wutzler und Sauerbrei 2009). Hier ist die Letalität sehr hoch, wie eine Studie von Kusne et al. (1991) zeigen konnte: Bei acht von zwölf Patienten führte eine HSV-Hepatitis zum Tod (Kusne et al. 1991). Zudem kommt es bei AIDS-Patienten öfter als bei immunkompetenten Personen zur Reaktivierung von HSV-2 im orofazialen Bereich (Fatahzadeh und Schwartz 2007).

## 2.9 Labordiagnostik

Eine eindeutige Erregerdiagnose des HSV ist nur durch Virusnachweis erreichbar. Deshalb besitzt dieser eine große Bedeutung in der Labordiagnostik. Es besteht die Möglichkeit eines elektronenmikroskopischen Nachweises, jedoch ist so die Abgrenzung zu anderen Herpesviren nicht durchführbar. Eine preiswertere und schnelle Alternative stellt der Direktnachweis von HSV-AG aus Bläscheninhalt und Gewebe mittels Immunfluoreszenztest (IFT) dar. Die akute Infektion mit HSV kann zudem durch Virusisolierung aus Bläschenabstrich oder Biopaten diagnostiziert werden, da sich das HSV in vielen Zelltypen gut repliziert. Der zytopathische Effekt zeigt sich hierbei fokal und besteht aus abgerundeten, synzytial verschmolzenen, vielkernigen Zellen mit nukleären Einschlüssen. Nach der Anzucht ist die Unterscheidung von HSV-1- und HSV-2-Isolaten mittels IFT oder Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) möglich (Bagg et al. 1989, Wutzler und Sauerbrei 2009). Methode der Wahl bei der Labordiagnostik des HSV ist heutzutage jedoch der virale Nukleinsäurenachweis mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) (Wutzler und Sauerbrei 2009). Diese ist hochsensitiv und gerade bei Verwendung von Liquor als Untersuchungsmaterial bei Verdacht auf eine HSV-Enzephalitis unverzichtbar, da die Virusanzucht hier extrem selten gelingt. Die stärksten Signale sind am vierten und fünften Tag nach dem ersten Auftreten neurologischer Symptome detektierbar (Wutzler 2002, Modrow et al. 2003). Zudem ermöglicht die PCR eine Unterscheidung zwischen den beiden Serotypen des HSV (Kimura et al. 1990). Die serologische Diagnostik dient vor allem der Bestimmung des HSV-Immunstatus sowie dem Nachweis der Serokonversion von HSV-spezifischem IgG. Die Differenzierung zwischen den beiden HSV-Typen kann zusätzlich durch die Bestimmung spezifischer AK gegen gG1 (HSV-1) bzw. gG2 (HSV-2) mittels ELISA oder Immunoblot (Bergström und Trybala 1996, Ohana et al. 2000) erfolgen. Außerdem ist es möglich, den IgM-Titer zum Nachweis einer akuten Primärinfektion zu bestimmen, was vor allem bei Diagnostik in der Schwangerschaft von Bedeutung sein kann (Wutzler und Sauerbrei 2009).

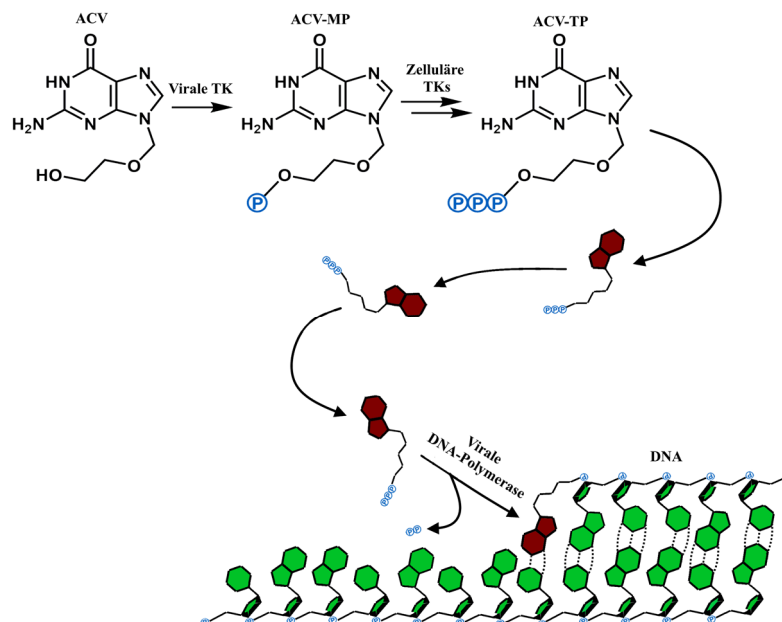
## 2.10 Antivirale Therapie

Die einzigen Mittel zur antiviralen Therapie von HSV-Infektionen waren bis in die frühen 1980er Jahre zytostatisch wirkende Präparate wie Adeninarabinosid und Idoxuridin. Diese konnten weitgehend nur lokal angewendet werden und verursachten gravierende Nebenwirkungen. Mit der Zulassung von ACV, einem Acycloguanosin, im Jahr 1982 änderten sich die

Möglichkeiten der Therapie bei Infektionen insbesondere mit dem HSV grundlegend (King 1988).

### ➤ Nukleosidanaloga

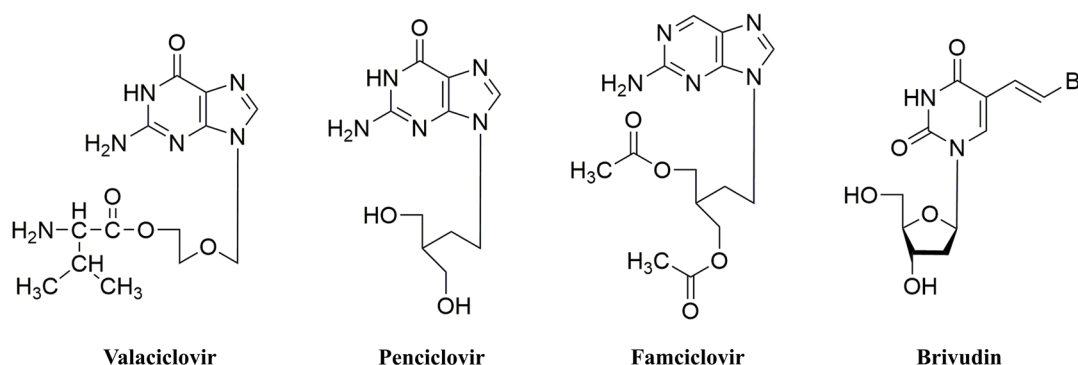
**Aciclovir** gilt heute als Goldstandard zur Therapie von HSV-Infektionen und kann lokal, oral und intravenös appliziert werden (Sauerbrei et al. 2010a). Es weist allerdings nach oraler Gabe eine Bioverfügbarkeit von nur ca. 27% auf (Bras et al. 2001). Außerdem ist ACV zur Prophylaxe bei häufigen HSV-Rezidiven und bei seropositiven Patienten nach Organtransplantation indiziert (Schneweis 2001). Das synthetische Guanosinanalogen muss, bevor es seinen antiviralen Effekt entfalten kann, in seine Wirkform, das ACV-Triphosphat (TP), überführt werden (DeClercq 2004a).



**Abb. 9: Überführung von ACV in seine Wirkform und Wirkungsentfaltung (modifiziert nach DeClercq 2004a).**

Wie in Abb. 9 dargestellt, wird die initiale Reaktion zum MP durch die herpesvirale TK katalysiert, was den Wirkstoff zu einem spezifischen Inhibitor der Replikation in infizierten Zellen macht und die Toxizität für nicht infizierte Zellen mindert (Elion 1982). Zelluläre TKs überführen das ACV-MP ins Diphosphat (DP) und schließlich ins TP. Dieses hemmt kompetitiv die virale DNA-Pol und wird zudem in den naszierenden DNA-Strang eingebaut, sodass das Fehlen der zur weiteren Verknüpfung nötigen Hydroxygruppe am 3'-Ende zum Kettenabbruch führt (Whitley et al. 1998, De Clercq 2004a, Wutzler und Sauerbrei 2009).

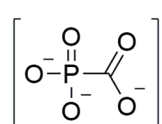
Bei Infektionen mit HSV-2 sind 3,5- bis 4,5-fach höhere Dosen an ACV nötig, sodass hier oft das oral applizierte Prodrug **Valaciclovir** (VACV), mit Valin (Val, V) verestertes ACV, eingesetzt wird. Dessen Struktur ist aus Abb. 10 ersichtlich. Valaciclovir hat mit ca. 45% (Bras et al. 2001) eine fast doppelt so hohe Bioverfügbarkeit wie ACV und erzeugt nach der Abspaltung von Val in der Leber hohe Plasmaspiegel an ACV (Schneweis 2001). Auch **Famciclovir** (FCV) ist ein Prodrug. Das Diacetyl-Derivat des Nukleosidanalogons **Penciclovir** (PCV) wird nach der oralen Applikation *in vivo* zu diesem umgesetzt. Abbildung 10 zeigt beide Präparate im Vergleich. Nach seiner Überführung ins TP durch virale und zelluläre Kinasen übertrifft PCV die Halbwertszeit von ACV um das zehnfache. Penciclovir selbst genauso wie das Nukleosidanalogon Trifluridin werden nur topisch bei Herpeskeratitiden angewendet (Schneweis 2001, Brady und Bernstein 2004, De Clercq 2004a, Wutzler und Sauerbrei 2009).



**Abb. 10: Weitere Nukleosidanaloga.**

Als zyklisches Nukleosidanalogon steht mit der gleichen Wirkweise das ebenfalls in Abb. 10 dargestellte **Brivudin** (5-(2-Bromvinyl)-2'-desoxyuridin, BVDU) zur Verfügung. Allerdings kann die HSV-2-TK im Gegensatz zur HSV-1-TK den nötigen zweiten Phosphorylierungsschritt von BVDU-MP zum DP nicht katalysieren, sodass BVDU keine Wirkung gegenüber HSV-2 zeigt (De Clercq 2004b).

### ➤ Weitere Antiherpetika

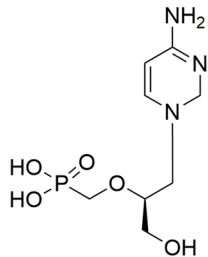


**Abb. 11: Foscarnet.**

Eine Alternative zu den Nukleosidanaloga sind das Pyrophosphatanalogon **Foscarnet** (Trinatrium-Phosphono-Formiat, FOS), welches die Pyrophosphatbindestelle der DNA-Pol blockiert und diese damit inhibiert, und das nt-Analogon **Cidofovir** (CDV), das Kettenabbrüche im naszierenden

DNA-Strang induziert. Diese sind in den Abb. 11 und 12 (S. 20) zu sehen. Foscarnet liegt

bereits in seiner aktiven Form vor und auch CDV ist schon einfach phosphoryliert und wird durch zelluläre Kinasen ins wirksame DP überführt, sodass beide Präparate keine Spezifität für infizierte Zellen zeigen (Crumpacker 1992, Brady und Bernstein 2004, Fatahzadeh und Schwartz 2007). Cidofovir weist jedoch eine höhere Spezifität für die virale als für die humane DNA-Pol auf (Yang und Datema 1991). Wegen seiner nephrotoxischen Nebenwirkungen



ist FOS nur zur Behandlung bei HSV-Infektionen mit ACV-resistenten Stämmen zugelassen. Cidofovir zeigt noch stärkere Nephrotoxizität und ist ausschließlich bei der Therapie von CMV-Retinitis bei AIDS-Patienten indiziert. Deshalb kann es bei ACV- und FOS-resistenten HSV-Stämmen nur im off-label use angewendet werden (Crumpacker 1992, Brady und

**Abb. 12: Cidofovir.** Bernstein 2004, Fatahzadeh und Schwartz 2007).

### ➤ Neue Ansätze bei der Therapie von Herpes-simplex-Virus-Infektionen

Aktuelle Studien zeigen, dass auch Helikase-Primase-Inhibitoren (HPI) die Replikation des HSV hemmen. Der genaue Wirkmechanismus ist noch ungeklärt. Man geht aber davon aus, dass diese die Bindung zwischen der DNA und dem Helikase-Primase-Komplex verstärken. Auf diese Weise verhindern sie die Entwindung des Doppelstranges durch die Helikase und das Anfügen von einzelsträngigen Primern durch die Primase (Biswas und Field 2008). Helikase-Primase-Inhibitoren wirken gegen ein breites Spektrum von Herpesviren, da die Gene für den Helikase-Primase-Komplex in einer konservierten Region des Genoms liegen. Dies wurde *in vitro* für Amenamevir bewiesen, das die Replikation von HSV-1, -2 und VZV hemmt (Chono et al. 2010) und aktuell in einer klinischen Phase III-Studie überprüft wird (Tyring et al. 2012). Zudem konnten HPIs *in vitro* und im Mausmodell eine bessere Wirkung als ACV und VACV gegen HSV zeigen (Kleymann et al. 2002). So wurde die Replikation von ACV-resistenten HSV-Stämmen durch den HPI Pritelivir, der mittlerweile in einer Phase II-Studie getestet wird, gehemmt (Field et al. 2013). Dies konnte zuvor bereits für andere HPIs gezeigt werden (Kleymann et al. 2002, Biswas und Field 2008). Dennoch gelang es, laborexperimentell HSV-Stämme herzustellen, die Resistenzmutationen gegen HPIs beinhalten (Biswas et al. 2007). In bisherigen klinischen Studien traten HPI-resistente Stämme allerdings noch nicht auf. Da diese jedoch nur an wenigen, immungesunden Personen durchgeführt wurden, ist es möglich, dass sich bei Anwendung der Wirkstoffe an Immunsupprimierten und bei vermehrter Applikation andere Tendenzen zeigen (Field et al. 2013).

## 2.11 Resistenzen gegenüber Virostatika

Aciclovir ist zwar Mittel der Wahl bei der Therapie von HSV-Infektionen, kann jedoch durch Resistenzen von einzelnen Stämmen nicht immer seine Wirkung entfalten (Morfin et al. 2000a). Nachdem bereits 1980 experimentell ACV-resistente HSV-Stämme aufgezeigt werden konnten (Smith et al. 1980), wurden die ersten klinisch resistenten Isolate schon zwei Jahre später beschrieben (Crumpacker et al. 1982, Field und Wildy 1982, Parris und Harrington 1982). Dreißig Jahre nach Einführung der Therapie mit ACV haben Resistenzen bei Immungesunden mit einer Prävalenz von weniger als 1% keine klinische Relevanz (Danve-Szatanek et al. 2004, Frobert et al. 2014). Ausnahmen bilden allerdings Infektionen des Auges (Duan et al. 2008, van Velzen et al. 2013). Bei immundefizienten Patienten hingegen treten ACV-resistente HSV-Stämme in durchschnittlich 5,5% der Fälle auf (Fife et al. 1994, Bacon et al. 2003). Mit 30% bis 46% wurde die höchste Prävalenz von ACV-resistenten HSV-Stämmen bei Patienten mit allogener Stammzelltransplantation beschrieben (Chakrabarti et al. 2000, Morfin und Thouvenot 2003, Frobert et al. 2014). Hier kommt es durch langdauernde antivirale Therapie und Prophylaxe sowie durch eine verminderte Abwehrreaktion zur Selektion der resistenten Stämme (Crumpacker et al. 1982, Wade et al. 1983). Die Betroffenen leiden oft unter chronischen Schleimhautinfektionen mit dem Risiko der Dissemination (Momméja-Marin et al. 2003, Sevilla et al. 2004). Studien belegen, dass Patienten, denen aufgrund rekurrierender Infektionen hohe Dosen an ACV verabreicht werden, eine höhere Wahrscheinlichkeit haben, Träger von resistenten Stämmen zu sein, als vergleichbare Patienten mit einer geringeren Applikation von ACV (Englund et al. 1990). Darüber hinaus wurde eine Zunahme von Resistenzen um durchschnittlich rund 12% in den Jahren 2002 bis 2011 bei Immunsupprimierten, insbesondere bei Patienten mit Stammzelltransplantation (ca. 32%), festgestellt (Frobert et al. 2014).

### ➤ Mechanismen der Resistenzentstehung

In 95% der Fälle gelten Mutationen im TK-Gen als Ursache für Resistenzen gegen ACV und andere Nukleosidanaloga (Hill et al. 1991, Morfin und Thouvenot 2003). Diese können sich in unterschiedlicher Weise auf die Funktion der TK auswirken. Mehr als die Hälfte der Resistenzmutationen entstehen durch SNPs. Die übrigen Mutationen werden durch Baseninsertionen oder -deletionen verursacht, die meist in den homopolymeren HotSpots liegen (Sasadeusz et al. 1997, Sauerbrei et al. 2016). Diese Frameshift-Mutationen führen in einem Großteil der

Fälle zu einem vorzeitigen Stopp-Codon, sodass ein verkürztes, nicht funktionsfähiges Protein synthetisiert wird (TK<sup>-</sup>-Mutanten) (Schnipper und Crumpacker 1980, Sasadeusz et al. 1997). Auch Punktmutationen in der TK können in einem vorzeitigen Stopp-Codon resultieren. Wahrscheinlicher ist aber, dass sie den Austausch einzelner AS verursachen, sodass entweder TK<sup>-</sup>-Mutanten oder Mutanten mit einer veränderten Substratspezifität (TK<sup>A</sup>), die nur noch ihr natürliches Substrat dT phosphorylieren, ausgebildet werden. Außerdem kann eine Punktmutation eine reduzierte TK-Aktivität oder eine verringerte Produktion der TK (TK<sup>R</sup>) hervorrufen. In all den beschriebenen Fällen findet die primäre Phosphorylierung von ACV zu ACV-MP nicht oder nur in reduzierter Form statt, sodass ACV nicht wirksam werden kann (Larder und Darby 1984, Nugier et al. 1992, Gaudreau et al. 1998, Bacon et al. 2003). Studien belegen, dass in den meisten Fällen ein kompletter Funktionsausfall der TK vorliegt (Englund et al. 1990, Nugier et al. 1992). Mutationen in der TK, die ACV-Resistenz bedingen, liegen oft in den konservierten oder aktiven Bereichen des Gens oder betreffen das Cys an AS-Position 336 (Balasubramaniam et al. 1990, Evans et al. 1998, Stránská 2004). Jedoch konnte eine aktuelle Studie (Sauerbrei et al. 2016) zeigen, dass rund 65% der Resistenzmutationen in der TK außerhalb aktiver oder konservierter Bereiche liegen. Diese können zu einem Sensitivitätsverlust führen, wenn sie Konformationsänderungen der  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter des katalytischen Zentrums bedingen (Graham et al. 1986, Balasubramaniam et al. 1990, Evans et al. 1998, Saijo et al. 2008). Darüber hinaus scheinen die ersten 46 Codons der TK nicht relevant für Resistenzen zu sein (Halpern und Smiley 1984, Sauerbrei et al. 2016).

Aminosäuresubstitutionen im DNA-Pol-Gen bedingen die übrigen 5% der Resistenzen gegen Nukleosidanaloge oder FOS. Ursache für die geringere Häufigkeit ist, dass die Pol im Gegensatz zur TK ein für die Replikation obligatorisches Enzym ist. Folglich werden HSV-Stämme mit defizienter DNA-Pol ausgesiebt. Mutationen in diesem Gen führen oft zu Resistenzen gegenüber einer Vielzahl an Chemotherapeutika, da die DNA-Pol das finale Target für alle aktuell eingesetzten Antiherpetika darstellt (Larder und Darby 1985, Gaudreau et al. 1998, Gilbert et al. 2002). Der Großteil der Resistenz-assoziierten Mutationen ist in den konservierten Regionen II und III zu finden (Sauerbrei et al. 2016). In der am meisten konservierten Region I konnten bislang in klinischen Stämmen weder Resistenz-vermittelnde Mutationen noch natürliche Polymorphismen nachgewiesen werden. Experimentell hergestellte Mutanten mit AS-Substitutionen in diesem Bereich des Genoms erwiesen sich als letal (Marcy et al. 1990, Piret und Boivin 2011).



### ➤ Resistenztestung

Um die Sensitivität von HSV-Stämmen gegenüber Antiherpetika zu testen, können phäno- sowie genotypische Methoden angewandt werden. Bei phänotypischen Testen wird die Inhibitory Concentration 50% (IC<sub>50</sub>) oder 90% (IC<sub>90</sub>) bestimmt. Diese Werte entsprechen der Medikamentenkonzentration, bei der 50% bzw. 90% der Virusvermehrung in der Zellkultur inhibiert werden. Goldstandard zur Ermittlung dieser Werte ist der Plaquereduktionstest, der eine hohe Korrelation mit klinischen Parametern zeigt (Safrin et al. 1994, Morfin und Thouvenot 2003). Außerdem werden Dye-uptake-Tests (McLaren et al. 1983), DNA-Hybridisierungstests (Swierkosz et al. 1987), Durchflusszytometrie (Pavic et al. 1997) und ELISAs (Gerna et al. 1992) angewendet. Bisher wurde keine dieser Methoden standardisiert, obwohl viele Faktoren, wie z.B. die Verwendung von primären oder von immortalisierten Zellen, das Ergebnis beeinflussen. Zudem sind die Tests mit einer Dauer von sieben bis zehn Tagen sehr zeitaufwändig und das Ergebnis ist stark abhängig von der Testmethode sowie dem gewählten Grenzwert für Resistenz (Sauerbrei et al. 2010a). Auch das Vorliegen von Virusmischpopulationen aus sensitiven und resistenten Stämmen ist ein potentieller Störfaktor, da eine Resistenz phänotypisch nur nachgewiesen werden kann, wenn mehr als 20% der Viruspopulation resistent sind (Shin et al. 2001). Aus diesen Gründen werden phäno- und genotypische Methoden meist in Kombination angewandt (Boivin 1998, Gilbert et al. 2002, Sauerbrei et al. 2010a).

Genotypische Tests decken auf der Basis von Mutationen im TK- oder DNA-Pol-Gen Resistenzen auf. Hierfür werden das TK- und seltener auch das DNA-Pol-Gen mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Bei der Auswertung der Sequenzierdaten dient ein Referenzstamm als Kontrolle der AS-Veränderungen. Vorteil dieses Tests ist die schnelle Durchführbarkeit innerhalb von zwei Tagen (Gilbert et al. 2002). Die Auswertung gestaltet sich jedoch teilweise schwierig, da längst nicht alle Substitutionen in den betreffenden Genen zweifelsfrei Resistenzmutationen oder natürlichen Genpolymorphismen zugeordnet werden können (Lee et al. 1999, Morfin et al. 2000a). Es wird daran gearbeitet, möglichst viele AS-Austausche aufzuklären. Die bislang bekannten werden in einer regelmäßig aktualisierten Datenbank aufgeführt (Sauerbrei et al. 2016). Um die Signifikanz unbekannter AS-Substitutionen zu bestimmen, können phänotypische Tests an Virusisolaten durchgeführt werden. Hier darf jedoch neben bereits bekannten Polymorphismen maximal eine unklare Mutation in den TK- und Pol-Genen vorliegen (Bestman-Smith et al. 2001). Andernfalls muss

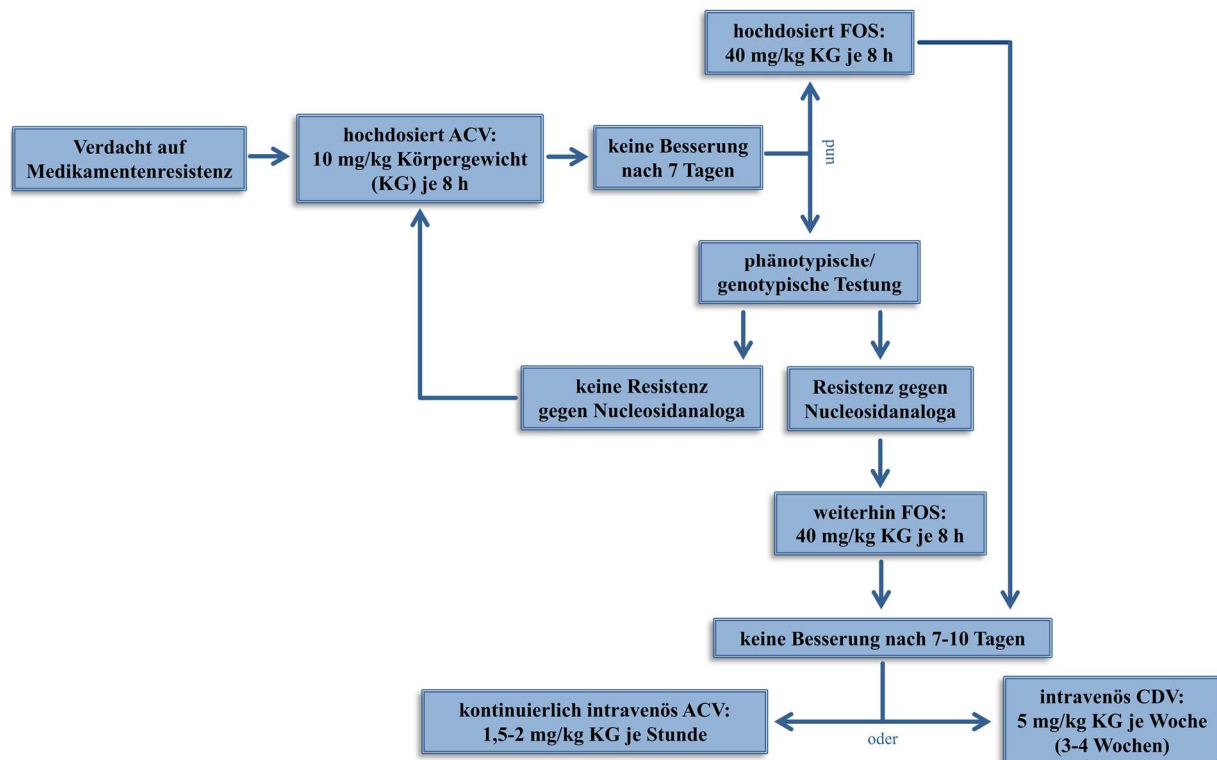
die Phänotypisierung an rekombinanten Viren, die nur die unklare Mutation enthalten, durchgeführt werden (Bestman-Smith und Boivin 2003, Piret et al. 2015). Zudem existieren verschiedene Aktivitätstests für rekombinante TK-Proteine. Zu diesen gehören der DiviTum<sup>TM</sup>-Test (Sauerbrei et al. 2012), der ADP-GLO<sup>TM</sup>-Test (Burrel et al. 2012), Aktivitätstests mit radionuklidgekoppeltem dT (Palu et al. 1989) und chromatographische (Pilger et al. 1999, Malartre et al. 2012) sowie massenspektrometrische (van Velzen et al. 2012) Methoden. Teilweise zeigten sich bislang allerdings widersprüchliche Resultate (Sauerbrei et al. 2012, van Velzen et al. 2013). Deshalb ist die Synthese rekombinanter, replikationsfähiger Viren mittels Cosmid-Sets (Bestman-Smith und Boivin 2003, Piret et al. 2015) bzw. Bacterial Artificial Chromosome (BAC)-Technologie (Brunnemann et al. 2016) ein neuer Ansatz, um unklare Ergebnisse aufzuklären. Generell ist zu sagen, dass Substitutionen, die in konservierten oder aktiven Genregionen liegen, eher zu Resistenz führen als die, die in nicht konservierten Bereichen zu finden sind (Frobert et al. 2005).

### ➤ **Management von Resistenzen**

Klinischer Verdacht auf Medikamentenresistenz sollte bestehen, wenn sich trotz hochdosierter Gabe von Antiherpetika keine Besserung des Krankheitsbildes innerhalb von sieben bis zehn Tagen einstellt, falls sich atypische Läsionen zeigen oder wenn auch nach drei bis vier Tagen trotz Therapie Satellitenläsionen auftreten. Insbesondere bei immundefizienten Patienten ist mit der Möglichkeit einer Resistenzentwicklung zu rechnen (Bacon et al. 2003, Piret und Boivin 2014). In Abb. 13 (S. 25) ist ein möglicher Behandlungsalgorithmus zur Therapie von nicht auf ACV ansprechenden HSV-Infektionen gezeigt. Die Entscheidung, welche Medikamente zu bevorzugen sind, wird je nach Ausprägung der Symptome im Einzelfall getroffen (Piret und Boivin 2014).

Liegt der Verdacht auf eine Resistenz gegen Nukleosidanaloga vor, besteht als alternative Therapieoption die Gabe von FOS. Hier wurden bislang nur selten Kreuzresistenzen beschrieben (Schmit und Boivin 1999, Burrel et al. 2013, Schubert et al. 2014), die vorwiegend nach kombinierter Therapie aus ACV und FOS entstanden (Chibo et al. 2002). Darüber hinaus sollte das definitive Vorliegen eines resistenten HSV-Stammes geno- oder phänotypisch nachgewiesen werden. Bei Mutationen im DNA-Pol-Gen kann es zudem zu Resistenzen gegen viele oder alle Antiherpetika kommen (Bacon et al. 2003, Piret und Boivin 2014). Einige dieser Stämme erwiesen sich jedoch als BVDU-sensitiv, sodass dieses eine Therapieoption

darstellt (Schubert et al. 2014). Da eine Resistenz gegen CDV bislang nur in Einzelfällen beschrieben wurde (Wyles et al. 2005), steht das Präparat bei Resistenzen gegen alle Nukleosidanaloga und FOS als Alternative im off-label use zur Verfügung. Voraussetzung hierbei ist, dass die Nierenfunktion des betroffenen Patienten nicht eingeschränkt ist und während der Therapie regelmäßig kontrolliert wird (Bacon et al. 2003).



**Abb. 13: Behandlungsalgorithmus bei Medikamentenresistenz von HSV (modifiziert nach Piret und Boivin 2014).**

Nach dem Abheilen der Läsionen ist bei stark immunsupprimierten Patienten eine Prophylaxe mit ACV, VACV oder FCV angebracht, da so die Virusreplikation eingedämmt und damit die Wahrscheinlichkeit einer Rekrudescenz verringert wird (Bacon et al. 2003). Zudem wird bei diesen Patienten eine nachfolgende Infektion häufig durch einen ACV-sensitiven HSV-Stamm ausgelöst, sodass ein erneuter Krankheitsausbruch durch die Prophylaxe verhindert werden kann (Snoeck et al. 1993).

### 3 Zielstellung

Während der Replikation des HSV kann es durch spontan auftretende AS-Substitutionen zur Entwicklung einer Resistenz gegen Antiherpetika kommen (Sauerbrei et al. 2010b), wobei 95% dieser Mutationen im TK-Gen lokalisiert sind (Morfin und Thouvenot 2003). Eine Selektion resistenter Virusstämme wird durch den breiten und prophylaktischen Einsatz antiviraler Substanzen begünstigt, wobei besonders immungeschwächte Personen von schwerwiegenden und lebensbedrohlichen Erkrankungen betroffen sind (Sauerbrei et al. 2010a). Eine mögliche ACV-Resistenz muss zweifelsfrei nachgewiesen werden, um eine adäquate Therapie zu gewährleisten (Sauerbrei et al. 2011). Der Plaquereduktionstest ist hierbei die Methode der Wahl zur Bestimmung des Resistenzphänotyps. Die Genotypisierung der viralen U<sub>L</sub>23- und U<sub>L</sub>30-Genregionen gewinnt jedoch immer mehr an Bedeutung, da auf diese Weise eine bestehende ACV-Resistenz in der überwiegenden Anzahl der Fälle innerhalb weniger Tage erkannt werden kann. Durch das Auftreten unbekannter, nichtsynonymer AS-Austausche kann jedoch auf Grundlage des Genotyps oftmals keine Aussage über das Resistenzverhalten getroffen werden. Die zweifelsfreie Charakterisierung dieser Substitutionen als natürliche Genpolymorphismen oder Resistenz-assoziierte Mutationen kann daher nur durch weiterführende Verfahren erfolgen (Sauerbrei et al. 2010a).

Primäres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bedeutung von 20 bislang unbekannten oder unklaren AS-Substitutionen im TK-Gen hinsichtlich ihrer ACV-Resistenz zu analysieren. Dafür sollten Klonierungsexperimente durchgeführt werden. Im ersten Schritt wurden die Substitutionen mittels ortsspezifischer Mutagenese in das TK-Gen des ACV-sensitiven Wildtyps (WT) in dem Plasmid pIX3.0 eingebracht, sodass dieses anschließend in *E. coli* kloniert werden konnte. Eine fehlerfreie Expression rekombinanter TK-Proteine mit Hilfe zellfreier *in vitro*-Proteinsynthese sollte durch die Kontrolle der Proteine mittels Western Blot erreicht werden. Die Aktivitätsbestimmung der rekombinanten TK-Proteine erfolgte durch einen modifizierten ELISA, wobei die Verifizierung der Ergebnisse durch die Mitführung mehrerer PK und RK sowie einer NK gewährleistet wurde. Als sekundäres Ziel der Arbeit sollten zwei funktionelle TK-Aktivitätsassays zur alternativen Testung der Phosphorylierungsaktivität gegenüber ACV und dT erarbeitet und abschließend hinsichtlich ihrer Eignung verglichen werden. Hierfür wurde in Anlehnung an bereits publizierte Studien zum einen Hochleistungsflüssigkeitschromatographie/Ultraviolett-spektroskopie (HPLC/UV, Pilger et al. 1999, Malartre et al. 2012) und zum anderen Flüssigchromatographie/Triple-Quadrupolmassenspektrometrie

(LC/MS/MS, van Velzen et al. 2012) verwendet. Alle erzielten Daten dienen dazu, die Interpretation genotypischer Resistenzbefunde des HSV-1 zu verbessern.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Untersuchte Aminosäuresubstitutionen

Die untersuchten AS-Substitutionen im TK-Gen von HSV-1 konnten durch genotypische Testung von DNA aus Patientenproben ermittelt werden. Neben dem TK-Gen wurde mit Ausnahme einer Probe (275-11), in der der DNA-Gehalt zu niedrig war, das DNA-Pol-Gen mittels PCR amplifiziert und sequenziert. Als Referenzstamm diente der ACV-sensitive HSV-1-Stamm 17 (GenBank Accession: X14112.1, Bohn et al. 2011, Sauerbrei et al. 2011). Zudem gelang es, 21 Stämme anzuzüchten und phänotypisch auf Resistenz gegenüber ACV zu testen. Lediglich der Stamm 275-11 konnte nicht kultiviert werden, da die Viruslast im Patientenmaterial zu gering war. Eine Übersicht über die in diese Arbeit einbezogenen AS-Substitutionen bzw. die Ergebnisse der geno- und phänotypischen Testungen bietet Tabelle (Tab.) 1.

**Tab. 1: Aminosäuresubstitutionen klinischer HSV-1-Stämme sowie Phänotyp.**

Literaturunbekannte AS-Substitutionen sind dick hervorgehoben.

NBS: Nukleosidbindestelle.

n.d.: nicht durchführbar.

nkR: nicht konservierte Region; kR: konservierte Region.

TK<sup>r</sup>: Resistenzmutation im TK-Gen; Pol<sup>r</sup>: Resistenzmutation im DNA-Pol-Gen.

TK<sup>u</sup>: unklare Mutation im TK-Gen; Pol<sup>u</sup>: unklare Mutation im DNA-Pol-Gen.

HSV-1-Stamm	AS-Substitution	Basen-substitution (3'→5')	Lage im Genom	Weitere unklare bzw. Resistenzmutationen	Phänotyp gegenüber ACV
185-93	A156V	G467C	nkR	N277K (TK <sup>u</sup> )	sensitiv
164-06	R89H	G266A+G267T	nkR	P84L (TK <sup>r</sup> ),	resistent
	R163G	C487G	kR		
	P173Deletion	Deletion (CCG) nt 517 - 516	NBS		
3571-09	A156V	G467C	nkR	-	resistent
275-11	<b>R20C</b>	C58T	nkR	keine Sequenzierung der Pol	n.d.
459-11	<b>E43A</b>	A128C	nkR	M85Stopp (TK <sup>r</sup> ) G191S (Pol <sup>u</sup> ) P1114H (Pol <sup>u</sup> )	resistent
474-11	<b>P269S</b>	C805T	nkR	R216H (TK <sup>r</sup> ) A748T (Pol <sup>u</sup> )	resistent
202-12	G271V	G812T	nkR	I182V (Pol <sup>u</sup> ) G841S (Pol <sup>r</sup> )	resistent
207-12	G264V	G791T	nkR	N815S (Pol <sup>r</sup> )	resistent
215-12	R32H	G95A	nkR	D672N (Pol <sup>u</sup> )	resistent
242-12	S276N	G827A	nkR	R222H (TK <sup>r</sup> )	resistent
405-12	N376Stopp	Insertion (C) nt 1061 - 1065	nkR	E662D (Pol <sup>u</sup> ) M1226I (Pol <sup>u</sup> )	resistent
406-12	A93V	C278T	nkR	T1121M (Pol <sup>u</sup> )	resistent

Fortsetzung Tab. 1.

HSV-1-Stamm	AS-Substitution	Basen-substitution (3'→5')	Lage im Genom	Weitere unklare bzw. Resistenzmutationen	Phänotyp gegenüber ACV
409-12	E43D	GT129	nkR	T183Stopp (TK <sup>r</sup> ) E421V (Pol <sup>u</sup> )	resistent
285-13	<b>M121K</b>	T362A	nkR	-	resistent
	N244H	A730C			
01-14	<b>Q15K</b>	C43A	nkR	-	resistent
	<b>E43A</b>	A128C			
	A93V	C278T			
	<b>I326V</b>	A976G			
05-14	<b>M121K</b>	T362A	nkR	-	fraglich
	<b>N244H</b>	A730C			
	<b>V238F</b>	G712T			
80-14, 132-14	<b>G61E</b>	G182A	ATP-Bindestelle	Q15P (TK <sup>u</sup> ), T27M (TK <sup>u</sup> ), D228Stopp (TK <sup>r</sup> ), T188I (Pol <sup>u</sup> )	resistent
81/82-14, 130/131-14	<b>G61E</b>	G182A	ATP-Bindestelle	Q15P (TK <sup>u</sup> ), T27M (TK <sup>u</sup> ), T188I (Pol <sup>u</sup> )	resistent

Unter Einbezug von Literatur ließen sich die Substitutionen R32H, E43D, G264V, G271V N376Stopp (Schubert et al. 2014) und R89H, R163G, P173Deletion (Sauerbrei et al. 2010a) sowie A93V (Karaba et al. 2012), A156V (Sauerbrei et al. 2011, Schmidt et al. 2015) und S276N (Schmidt et al. 2015) als AS-Veränderungen mit unklarer Auswirkung auf die Empfindlichkeit gegenüber ACV klassifizieren. Für diese konnten in bisherigen Publikationen noch keine bzw. nicht übereinstimmende oder eindeutige Ergebnisse bezüglich der TK-Aktivität erzielt werden. Auch durch den Abgleich der Ergebnisse aus phänotypischen und genotypischen Analysen war es nicht möglich, die AS-Substitutionen zweifelsfrei den natürlichen Genpolymorphismen oder den Resistenz-assoziierten Mutationen zuzuordnen, da weitere unklare bzw. Resistenzmutationen entweder in der TK oder der DNA-Pol vorlagen.

## 4.2 Kontrollproben

Als PK für den Western-Blot, den DiviTum<sup>TM</sup>-TK-Aktivitätstest sowie die Experimente mittels HPLC/UV und LC/MS/MS wurde das rekombinante TK-Protein aus dem Isolat des HSV-1-WT-Stammes 2110-08 (WT 232, GenBank Accession: JQ352247.1) mitgeführt. Dieses enthält die bekanntermaßen Polymorphismus-assoziierten AS-Substitutionen D14Y, N23S, K36E, L42P, A265T und V348I. Zudem weist der Stamm mehrere stille Mutationen auf. Ent-

sprechend dieser genetischen Grundlage wurde dieser phänotypisch als ACV-sensitiv eingestuft (Bohn et al. 2011).

Das rekombinante TK-Protein des HSV-1-Stammes 3579-09 (GenBank Accession: JQ352267.1, Sauerbrei et al. 2011) mit dem Basenaustausch von Cytosin zu Thymin an nt-Position 748 wurde als RK für den Western Blot und den DiviTum<sup>TM</sup>-Test verwendet. Durch ein vorzeitiges Stopp-Codon an AS-Position 250 wird eine verkürzte TK synthetisiert, welche nicht funktionsfähig ist und zu phänotypischen Resistenzen gegenüber ACV, PCV und BVDU führt (Sauerbrei et al. 2011). Bei den Untersuchungen mittels HPLC/UV sowie LC/MS/MS wurde ein Protein mit der literaturbekannten Resistenzmutation R216H (Stránská et al. 2004, van Velzen et al. 2013) als RK verwendet. Als NK im Western Blot sowie im DiviTum<sup>TM</sup>-Assay diente das Protein des Vektors pIX3.0 ohne TK-Gen-Insert (Sauerbrei et al. 2012). Darüber hinaus wurden rekombinante TK-Proteine, die außer den Polymorphismen des WT 232 die Polymorphismen A156P und P268M enthielten, als zusätzliche PK (zPK) beim DiviTum<sup>TM</sup>-Test mitgeführt. Proteine mit den Resistenzmutationen L170P, S181N, T183Stopp und R216H dienten als weitere RK (zRK). Informationen über die Laborstämme, in denen diese Veränderungen auftraten, genotypische und phänotypische Analysen sowie Literaturbelege sind in Tab. 2 aufgezeigt.

**Tab. 2: Positiv- und Resistenzkontrollen.**

NBS: Nukleosidbindestelle.

nkR: nicht konservierte Region; kR: konservierte Region.

TK<sup>r</sup>: Resistenzmutation im TK-Gen; TK<sup>s</sup>: Polymorphismus im TK-Gen.

TK<sup>u</sup>: unklare Mutation im TK-Gen; Pol<sup>u</sup>: unklare Mutation im DNA-Pol-Gen.

HSV-1-Stamm	AS-Substitution	Funktion	Lage im Genom	Weitere unklare bzw. Resistenzmutationen	Phänotyp gegenüber ACV	Literatur
268-88	A156P (TK <sup>s</sup> )	zPK	nkR	E1085D (Pol <sup>u</sup> )	sensitiv	Schmidt et al. 2015
409-00	P268M (TK <sup>s</sup> )	zPK	nkR	-	sensitiv	Schmidt et al. 2015
2110-08	D14Y, N23S, K36E, L42P, A265T, V348I (TK <sup>s</sup> )	WT 232	nkR	-	sensitiv	Bohn et al. 2011
3579-09	Q250Stopp (TK <sup>r</sup> )	RK	nkR	-	resistent	Sauerbrei et al. 2011
474-11	R216H (TK <sup>r</sup> )	zRK	kR	A748T (Pol <sup>u</sup> )	resistent	Stránská et al. 2004, van Velzen et al. 2013



Fortsetzung Tab. 2.

HSV-1-Stamm	AS-Substitution	Funktion	Lage im Genom	Weitere unklare bzw. Resistenzmutationen	Phänotyp gegenüber ACV	Literatur
204-12	L170P (TK <sup>r</sup> )	zRK	NBS	D228Stopp (TK <sup>r</sup> ) P829S (Pol <sup>u</sup> )	resistent	Burrel et al. 2010, Burrel et al. 2012
409-12	T183Stopp (TK <sup>r</sup> )	zRK	nkR	E43D (TK <sup>u</sup> ) E421V (Pol <sup>u</sup> )	resistent	Gaudreau et al. 1998
414-12	S181N (TK <sup>r</sup> )	zRK	nkR	keine Sequenzierung der DNA-Pol	resistent	Duan et al. 2008

### 4.3 Materialien und Geräte

In den Tab. 3 bis 8 (S. 31 - 35) sind die in der Arbeit verwendeten Substanzen, Lösungen, Medien, Kits, Geräte und Software unter Angabe von Hersteller und Firmensitz ersichtlich.

Tab. 3: Chemikalien mit Herstellerangabe.

Substanz	Hersteller
6x-His Epitope Tag Antibody (HIS.H8)	Thermo Scientific, Schwerte
Aciclovir (ACV)	Wellcome Foundation, London (UK)
Aciclovir Monophosphate (ACV-MP)	Santa Cruz Biotechnology, Dallas (USA)
Agar Agar SERVA Kobe I	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Agarose GTQ	Roth, Karlsruhe
Alkalische Phosphatase (AP)	Bio-Rad, Richmond (USA)
Ameisensäure	Sigma-Aldrich, München
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad, Richmond (USA)
Ampicillin (Amp)-Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
Adenosine 5'-diphosphate (ADP)	Sigma-Aldrich, München
Adenosintriphosphat (ATP)-Natriumsalz	PanReac AppliChem, Darmstadt
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bradford-Reagenz	Sigma-Aldrich, München
Bromphenolblau-Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid	Roth, Karlsruhe
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München
DNA-Hyper Ladder I (HL)	Bioline, Luckenwalde
Donkey anti-Mouse IgG Secondary Antibody, HRP conjugate	Thermo Scientific, Schwerte
EcoRI	Fermentas, St. Leon Roth
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid (EtBr)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Guanosin	VWR International, Darmstadt

Fortsetzung Tab. 3.

Substanz	Hersteller
Guanosinmonophosphat (GMP)	Sigma-Aldrich, München
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe
HSV-1 Thymidine Kinase (vN-20) goat polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnology, Dallas (USA)
Immobilon <sup>TM</sup> Western Chemiluminescent HRP Substrate	Millipore Corporation, Billerica (USA)
Isopropanol	Sigma-Aldrich, München
lysogeny broth (LB) Miller	Sigma-Aldrich Life Science, St. Louis (USA)
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich, München
Magermilchpulver	J. M. Gabler Saliter, Obergünzburg
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich, München
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
Nitroblau-Tetrazoliumchlorid/5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat-Tablets (NBT/BCIP)	Roche, Mannheim
PageRuler <sup>TM</sup> Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, Schwerte
Pierce <sup>TM</sup> Lane Marker Reducing Sample Buffer	Fermentas, St. Leon Roth
R1317 AP anti goat IgG (H&L) AP	Acris, Herford
Rinderserumalbumin (BSA)	Promega, Mannheim
Rotiphorese Gel 30 (Acrylamid)	Roth, Karlsruhe
SOC-Medium	Alfa Aesar GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Sodium-Dodecyl-Sulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Thymidine (dT)	Alfa Aesar, Ward Hill (USA)
Thymidine 5'-monophosphate (dTMP)	Sigma-Aldrich, München
Tetramethylenethyldiamid (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Polyoxyethylen(20)-Sorbitan-Monolaurat (Tween 20)	Sigma-Aldrich, München
Tango-Puffer (10X)	Fermentas, St. Leon Roth
XhoI	Fermentas, St. Leon Roth

Tab. 4: Lösungen, deren Verwendung und Zusammensetzung.

Sofern nicht anderweitig angegeben, wurden alle Stoffe in Aqua bidest. gelöst.

Verwendung	Lösung	Zusammensetzung
Gelelektrophorese	Agarosegel	1,0% Agarose in TBE-Puffer
	Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer)	0,8 Molar (M) Tris-HCl (pH=8,0) 83,0 Millimolar (mM) EDTA
	5 x Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer)	0,4 M Tris 0,4 M Borsäure 10,0 mM EDTA-Lösung (pH=8,0)
		pH=8,3 mit HCl/NaOH einstellen
	Probenladepuffer (LP)	32,9% Glycerol 6,7 mM EDTA-Lösung (pH=8,0) 1,8 Mikromolar (µM) Bromphenolblau

Fortsetzung Tab. 4

Verwendung	Lösung	Zusammensetzung	
HPLC/UV	Puffer A	2,5 mM	Tris-HCl (pH=7,2)
	Puffer B	2,5 mM 1,5 M	Tris-HCl (pH=8,0) KCl
HPLC/UV und LC/MS/MS	Phosphorylierungs-puffer	50,0 mM 5,0 mM 5,0 mM 2,0 mM	Tris-HCl (pH=7,2) ATP MgCl <sub>2</sub> ACV oder dT
LC/MS/MS	Equilibrierungspuffer	90,0% 10,0%	1% Ameisensäure Methanol
PCR	DEPC-Lösung	7,0 mM	DEPC
Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)	10 x Laufpuffer	11,4% 0,3 M 0,3 M	Glycerol SDS Tris-HCl (pH=8,3)
Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)	4 x Sammelgelpuffer	0,5 M 14,0 mM	Tris-HCl (pH=6,8) SDS
	4 x Trenngelpuffer	1,5 M 14,0 mM	Tris-HCl (pH=8,8) SDS
Western Blot	Blockierungslösung	5,0%	Magermilchpulver
	Blotpuffer	20%	Methanol
		1,1 % 25,0 mM	Glycerol Tris
	Tris-buffered Saline (TBS)	0,2 M 10,0 mM	NaCl Tris-HCl (pH=8,0)
	Tris-buffered Saline mit Tween 20 (TBST)	0,2 M 10,0 mM 0,05%	NaCl Tris-HCl (pH=8,0) Tween 20

Tab. 5: Medien, deren Verwendung und Zusammensetzung.

Sofern nicht anderweitig angegeben, wurden alle Stoffe in Aqua bidest. gelöst.

Verwendung	Medium	Zusammensetzung	
Kultivierung von <i>E. coli</i>	LB-Medium	2,5% autoklavieren	LB broth Miller
	LB-Medium + Amp (LB <sub>amp</sub> )	0,01%	Amp in LB-Medium
	LB-Agarplatten + Amp	2,5% 1,0% autoklavieren 0,01% Amp hinzugeben	LB broth Miller AgarAgar SERVA

Tab. 6: Kitsysteme mit Herstellerangabe.

Kit-System	Hersteller
AccuRapid™ Cell-Free Protein Expression Kit	Bioneer, Daejeon (Korea)
DiviTum™-Kitsystem	Biovica International AB, Uppsala (Schweden)
EasyXpress® Protein Synthesis Kit	Qiagen, Hilden
Geneart™ Site-Directed Mutagenesis System	Invitrogen, Carlsbad (USA)

Fortsetzung Tab. 6.

Kit-System	Hersteller
Gravity flow <i>Strep</i> -Tactin® Sepharose® column	iba, Göttingen
HotStar Taq™ DNA Polymerase 1000 units Kit	Qiagen, Hilden
NucleoBond® Xtra Midi Kit	Macherey-Nagel, Düren
Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
Quick Coomassie™ stain	Serva, Heidelberg
QIAquick® Gel Extraktion Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
<i>Strep</i> -tag® Protein Purification Buffer Set	iba, Göttingen

Tab. 7: Geräte mit Herstellerangabe.

Gerät	Hersteller
Abzug mc6® Das Laborsystem, Elektromodul	Waldner Laboreinrichtungen GmbH&Co. KG, Wangen
Agilent Series 1100 HPLC	Hewlett Packard, Waldbronn
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Brutschrank keltivron®+	Heraeus Instruments, Hanau
Centrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge 5410	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge 5418	Eppendorf, Hamburg
Clean Bench HERA Safe Thermo Electron Corporation	Heraeus Instruments, Hanau
Deuterium Lamp G1314 Var Wavelength	Agilent Technologies, Santa Clara (USA)
Dynatech Kinetic Microplate Reader MR 5000 Dias	Dynex Technologies, Chantilly (USA)
Elite LaChrom Pump L-2130	Hitachi, Tokio (Japan)
Eismaschine AF 200	Scotsman, Mailand (Italien)
Electrophoreses Power Supply E 835	Sigma-Aldrich, München
Electrophoreses Power Supply Consort EPS 300	Sigma-Aldrich, München
Elektronikrührer Variomag® Mono	Sigma-Aldrich, München
Gel Electrophoresis Chamber Mini Vertical	neoLab Migge, Heidelberg
Heraeus MultiFuge X1 R	Thermo Scientific Fisher, Waltham (USA)
HPLC-Säule NUCLEOSIL® 4000-7 PEI 200 µl	Macherey-Nagel, Düren
ImageQuant LAS 4000 Series	Fujifilm Europe GmbH, Düsseldorf
Innova 4000 Incubator Shaker	New Brunswick Scientific/ Eppendorf, Hamburg
HPLC-Säule Multohigh 100 RP 18 - 3µm	CS-Chromatographie Service, Langerwehe
Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad, Hercules (USA)
MS2-Minishaker	Jahnke & Kunkel IKA® Labortechnik, Staufen
NanoDrop Spectrophotometer	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
pH-Meter SevenEasy	Mettler-Toledo, Columbus (USA)
Plattenschüttelgerät HS250	Jahnke & Kunkel IKA® Labortechnik, Staufen
PTC-200 Peltier Thermal Cycler DNA-Engine	MJ-Research, Quebec (Kanada)
QTrap® LC/MS/MS System	AB Sciex, Darmstadt
Branson Sonifier 450	G. Heinemann Ultraschall- und Labortechnik, Schwäbisch Gmünd
Spectrafluor Fluorescence and Absorbance Reader	Tecan Group Ltd., Männedorf (Schweiz)

Fortsetzung Tab. 7.

Gerät	Hersteller
T3-Thermocycler	Biometra®, Göttingen
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Trio-Thermoblock	Biometra®, Göttingen
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York (USA)
VX-2500 Multi-Tube Vortexer	VWR International GmbH, Radnor (USA)
White Light Top E.A.S.Y. RH-3	Herolab, Wiesloch

Tab. 8: Software mit Herstellerangabe.

Software	Hersteller
Analyst 1.4	AB Sciex, Framingham (USA)
Revelation 3.2	DYNEX Technologies, Chantilly (USA)
Magellan™ 7.2	Tecan, Männedorf (Schweiz)
Molecular Evolution Genomics Analytics 5.1 (MEGA)	Center of Evolutionary Functional Genomics, Arizona (USA)
Microsoft Office	Microsoft Corporation, Redmond (USA)
ND 1000-Analysesoftwarem	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
ValueSolution ChemSoftware	Agilent Technologies, Santa Clara (USA)

#### 4.4 Site-directed Mutagenesis

##### ➤ Definition der mutagenen Primer

Vor der Mutagenese mussten Primer definiert werden. Hierbei diente die Sequenz des HSV-1-Stammes 17 (GenBank Accession: X14112.1) als Referenz. Pro Mutation wurden ein Vorwärts (*forward*)- und ein Rückwärts (*reverse*)-Primer erstellt. Der Vorwärtsprimer mit der gewünschten Basensubstitution wies eine Länge von 36 bis 41 nt auf und der zum Stamm 17 komplementäre Rückwärtsprimer eine Länge von 30 nt. Die Primer besaßen eine Überlappung von 15 nt am 5'-Ende. In Abb. 14 (S. 36) ist ihr Aufbau am Beispiel der AS-Substitution Q15K, die dem Basenaustausch C43A entspricht, schematisch dargestellt.

Da bei der Herstellung des Plasmids mit der AS-Substitution E43A wiederholt zusätzlich der Austausch G39E entstand, musste hier ein zweites Primerpaar (E43D-E39G) definiert werden. Dieses diente dazu, die ungewünschte Substitution zu entfernen. Tabelle 9 (S. 36) zeigt die Basensequenzen aller eingesetzten mutagenen Primer. Diese wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert.

<b>Referenzstamm 17</b>	5'- CCC TGC CAT CAA CAC GCG TCT GCG TTC GAC <b>CAG</b> GCT GCG CGT TCT C -3'
<b>Vorwärtsprimer</b>	5'- <b>AAC ACG CGT CTG CGT TCG AC</b> <b>A</b> AGG CTG CGC GTT CTC -3'
<b>Rückwärtsprimer</b>	3'- GGG ACG GTA G <b>TT GTG CGC AGA CGC AAG CTG</b> -5'

**Abb. 14: Aufbau der mutagenen Primer am Beispiel der Substitution Q15K.**

Die mutagene Stelle ist rot gedruckt, die überlappenden Bereiche sind gelb hervorgehoben.

**Tab. 9: Sequenzen der mutagenen Primer.**

Die mutagene Stelle ist rot markiert.

AS-Substitution	Primer	Sequenz (von 5' nach 3')	nt-Substitution
Q15K	<i>forward</i>	AAC ACG CGT CTG CGT TCG AC <b>A</b> AGG CTG CGC GTT CTC	C43A
	<i>reverse</i>	GTC GAA CGC AGA CGC GTG TTG ATG GCA GGG	
R20C	<i>forward</i>	TCG ACC AGG CTG CGC GTT CT <b>T</b> GCG GCC ATA ACA ACC	C58T
	<i>reverse</i>	AGA ACG CGC AGC CTG GTC GAA CGC AGA CGC	
E43A	<i>forward</i>	AGC CAC GGA AGT CCG CCT GG <b>C</b> GCA GAA AAT GCC CAC	A128C
	<i>reverse</i>	CCA GGC GGA CTT CCG TGG CTT TTT GTT GCC	
E43D	<i>forward</i>	GCC ACG GAA GTC CGC CTG GAT <b>T</b> CAG AAA ATG CCC ACG	G129T
	<i>reverse</i>	TCC AGG CGG ACT CCT GTG GCT TTT TGT TGC	
E43A-E39G	<i>forward</i>	CGC CGG CAA CAA AAA GCC ACG GA <b>A</b> GTC CGC CCG GAT	G116A
	<i>reverse</i>	GTG GCT TTT TGT TGC CGC CGA GGG CGC AAC	
G61E	<i>forward</i>	AGA CGG TCC CCA CGG GAT GG <b>A</b> GAA AAC CAC CAC CAC	G182A
	<i>reverse</i>	CCA TCC CGT GGG GAC CGT CAT TAT AAA CCC	
R89H	<i>forward</i>	CGA GCC GAT GAC TTA CTG GCA <b>T</b> GTT GGG GGC TTC C	G2664A+G267T
	<i>reverse</i>	GCC AGT AAG TCA TCG GCT CGG GTA CGT AGA	
A93V	<i>forward</i>	TTA CTG GCG GGT GTT GGG GG <b>T</b> TTC CGA GAC AAT CGC	C278T
	<i>reverse</i>	CCC CCA ACA CCC GCC AGT AAG TCA TCG GCT	

Fortsetzung Tab. 9.

AS-Substitution	Primer	Sequenz (von 5' nach 3')	nt-Substitution
M121K	<i>forward</i>	CGG GGA CGC GGC GGT GGT AA <b>A</b> GAC AAG CGC CCA GAT	T362A
	<i>reverse</i>	TTA CCA CCG CCG CGT CCC CGG CCG ATA TCT	
A156P	<i>forward</i>	GCT CAC ATG CCC CGC CCC CG <b>C</b> CCC TCA CCC TCA TCT	G466C
	<i>reverse</i>	CGG GGG CGG GGC ATG TGA GCT CCC AGC CTC	
A156V	<i>forward</i>	CTC ACA TGC CCC GCC CCC GG <b>T</b> CCT CAC CCT CAAT CTT	C467T
	<i>reverse</i>	CCG GGG GCG GGG CAT GTG AGC ACC CAG CCT	
R163G	<i>forward</i>	CCC TCA CCC TCA TCT TCG AC <b>G</b> GCC ATC CCA TCG CCG	C487G
	<i>reverse</i>	GTC GAA GAT GAG GGT GAG GGC CGG GGG CGG	
L170P	<i>forward</i>	CCA TCC CAT CGC CGC CCT CC <b>C</b> GTG CTA CCC GGC CGC	T509C
	<i>reverse</i>	GGA GGG CGG CGA TGG GAT GGC GGT CGA AGA	
P173Deletion	<i>forward</i>	TCG CCG CCC TCC TGT GCT AC --- GCC CGC GCA TAC CTT	Deletion (CCG) nt 517 - 519
	<i>reverse</i>	GTA GCA CAG GAG GGC GGC GAT GGG ATG GCG	
S181N	<i>forward</i>	CGC GCG ATA CCT TAT GGG CA <b>A</b> CAT GAC CCC CCA GGC	G542A
	<i>reverse</i>	TGC CCA TAA GGT ATC GCG CGG CCG GGT AGC	
T183Stopp	<i>forward</i>	CCG TTC TGG CTC CTC ATA TCG G <b>GG</b> GGG GGA GGC TGG GAG CT	Insertion (GG) nt 430-438
	<i>reverse</i>	GAT ATG AGG AGC CAG AAC GGC GTC GGT CAC	
R216H	<i>forward</i>	GGA GGA CAG ACA CAT CGA CC <b>A</b> CCT GGC CAA ACG CCA	G647A
	<i>reverse</i>	GGT CGA TGT GTC TGT CCT CCG GAA GGG CCC	
N244H	<i>forward</i>	GCG TTT ATG GGC TGC TTG CC <b>C</b> ATA CGG TGC GGT ATC	A730C
	<i>reverse</i>	GGC AAG CAG CCC ATA AAC GCG GCG AAT CGC	
V238F	<i>forward</i>	TGC TGG CCG CGA TTC GCC GC <b>T</b> TTT ATG GGC TGC TTG	G712T
	<i>reverse</i>	GCG GCG AAT CGC GGC CAG CAT AGC CAG GTC	

Fortsetzung Tab. 9.

AS-Substitution	Primer	Sequenz (von 5' nach 3')	nt-Substitution
G264V	<i>forward</i>	GGA TTG GGG ACA GCT TTC GGT GGC GGC CGT GCC GCC	G791T
	<i>reverse</i>	CCG AAA GCT GTC CCC AAT CCT CCC GCC ACG	
P268M	<i>forward</i>	AGC TTT CGG GGG CGG CCG TGA TGC CCC AGG GTG CCG A	C802A+C803T
	<i>reverse</i>	CAC GGC CGC CCC CGA AAG CTG TCC CCA ATC	
P269S	<i>forward</i>	TTT CGG GGG CGG CCG TGC CGT CCC AGG GTG CCG AGC	C805T
	<i>reverse</i>	CGG CAC GGC CGC CCC CGA AAG CTG TCC CCA	
G271V	<i>forward</i>	GGC GGC CGT GCC GCC CCA GGT TGC CGA GCC CCA GAG	G812T
	<i>reverse</i>	CCT GGG GCG GCA CGG CCG CCC CCG AAA GCT	
S276N	<i>forward</i>	CCA GGG TGC CGA GCC CCA GAA CAA CGC GGG CCC ACG	G827A
	<i>reverse</i>	TCT GGG GCT CGG CAC CCT GGG GCG GCA CGG	
I326V	<i>forward</i>	TCC GTC CCA TGC ATG TCT TTG TCC TGG ATT ACG ACC	A976G
	<i>reverse</i>	AAA GAC ATG CAT GGG ACG GAG GCG TTT GGC	
N367Stopp	<i>forward</i>	GGT CCA GAC CCA CGT CAC CAC CC CAG GCT CCA TAC CGA CG	Insertion (C) nt 1061-1065
	<i>reverse</i>	TGG TGA CGT GGG TCT GGA CCA TCC CGG AGG	

### ➤ Methylierungs- und Mutagenese-Polymerasekettenreaktion

Das GeneArt™ Site-Directed Mutagenesis System Kit ermöglichte es, die TK des WT 232 mit der gewünschten Mutation in das Plasmid pIX3.0 einzubringen. Bei diesem Kitsystem verläuft der Mutagenese-Prozess in zwei Schritten. Zuerst werden die Cys des TK-Gens des WT 232 durch die DNA-Methylase methyliert, wobei S-Adenosyl-Methionin (SAM) als Methylgruppen-Donor fungiert. Anschließend erfolgt die Mutagenese-Reaktion, bei der die AccuPrime™ Pfx Taq Pol das methylierte Plasmid amplifiziert, sodass die vorher definierten Oligonucleotidprimer die gewünschte Mutation einfügen. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes und die PCR-Bedingungen sind in den Tab. 10 und 11 (S. 39) zu finden. In der Regel wurde hierbei eine Menge von 20 Nanogramm (ng) WT-Plasmid-DNA verwendet. Zeigte die folgende Agarosegelelektrophorese eine zu schwache Bande, führte der Einsatz von 25 ng



DNA zu einer höheren Amplifikatausbeute. Entsprechend variierte das Volumen an RNase-freiem Wasser.

**Tab. 10: Pipettierschema des Methylierungs- und Mutagenese-PCR-Ansatzes.**

SAM: S-Adenosyl-Methionin.

Taq: *Thermophilus aquaticus*.

Lösung	Volumen [ $\mu$ l]	Endkonzentration
AccuPrime™ Pfx Reaktionsmix (10 x)	5	1 x
Enhancer (10 x)	5	1 x
<i>forward</i> -Primer (10 $\mu$ M)	1,5	0,3 $\mu$ M
<i>reverse</i> -Primer (10 $\mu$ M)	1,5	0,3 $\mu$ M
25 x SAM (1:8 verdünnt aus Stammlösung 200 x SAM)	2	1 x
DNA-Methylase (4 U/ $\mu$ l)	1	4 U
AccuPrime™ Pfx Taq Polymerase (2,5 U/ $\mu$ l)	0,4	1 U
Plasmid-DNA von WT 232 (519,86 ng/ $\mu$ l)	0,38	0,4 ng/ $\mu$ l
RNase-freies Wasser	33,22	-
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>50</b>	<b>-</b>

**Tab. 11: PCR-Bedingungen der Methylierungs- und Mutagenese-PCR.**

kb: Kilobasenpaar.

Phase	Temperatur [ $^{\circ}$ C]	Dauer	Anzahl der Zyklen
<b>Methylierung</b>	37	20 min	1
<b>Initiale Denaturierung</b>	94	2 min	1
<b>Denaturierung</b>	94	20 s	18
<b>Annealing</b>	65	30 s	
<b>Elongation</b>	68	30 s/kb des Plasmids $\triangleq$ 3 min	
<b>Finale Elongation</b>	68	5 min	1
<b>Kühlung</b>	4	bis Probenentnahme	1

### ➤ Elektrophoretische Auftrennung der Amplifikate

Um die Größe der PCR-Amplifikate beurteilen zu können, folgte eine Agarosegelelektrophorese mit einem 1%igen Agarosegel (Tab. 4, S. 32) und 0,01% Ethidiumbromid (EtBr). Vor der Auftrennung wurden 2 Mikroliter ( $\mu$ l) PCR-Produkt mit 10  $\mu$ l einer 1:1 Lösung aus Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer) und Ladepuffer (LP, Tab. 4, S. 32) versetzt und 10  $\mu$ l von dem Gemisch auf das Gel aufgetragen. Als Molekulargewichtsstandard dienten 2  $\mu$ l Hyper Ladder I (HL), als Laufpuffer einfach konzentrierter Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer). Die elektrophoretische Auftrennung der Amplifikate erfolgte bei einer Spannung von 90 Volt (V) und einer Stromstärke von 240 Milliampere (mA) für 40 Minuten (min). Hierbei wanderten

die Fragmente aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA in Richtung Anode und trennten sich nach ihrer Größe auf. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht betrachtet. Da EtBr die Eigenschaft besitzt, mit den Basen der DNA zu interkalieren und bei Anregung mit UV-Licht der Wellenlänge von 300 Nanometer (nm) zu leuchten, zeigten sich die DNA-Fragmente durch das Erscheinen heller Banden. Hatten die Amplifikate die gewünschte Größe, konnten diese bei Vorliegen von Einzelbanden mittels QIAquick® PCR Purification Kit, bei Doppel- oder Mehrfachbanden mittels QIAquick® Gel Extraction Kit, aufgereinigt werden.

## 4.5 Aufreinigung der Amplifikate

### ➤ Aufreinigung bei Einzelbanden im Gelbild

Um Primer, Salze, nt, Enzyme und Pols von den Amplifikaten zu entfernen, wurden diese mittels QIAquick® PCR Purification Kit nach dem Protokoll des QIAquick® Spin Handbook gereinigt. Zuerst war es erforderlich, zu den verbliebenen 48 µl PCR-Produkt 240 µl Bindungspuffer zu geben und die Lösung bei 15000 mal Erdbeschleunigung ( $\times g$ ) für 1 min über eine QIAquick®-Spinsäule zu zentrifugieren. Um eine effiziente Adsorption der DNA an die Silica-Membran der Säule zu gewährleisten, war ein pH-Wert des Puffers von unter 7,5 essentiell, welcher sich durch Gelbfärbung bei Mischung mit dem Indikator I zeigte. Wies die Lösung einen orangenen oder violetten Farbton auf, deutete das auf eine pH-Wert-Erhöhung hin und erforderte die Hinzugabe von 1 µl 3 M Natriumacetat. Daraufhin färbte sich der Puffer gelb. Der Durchfluss wurde verworfen und die DNA mit 750 µl Waschpuffer gereinigt, wofür 5 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur (RT) und Zentrifugation bei 15000  $\times g$  für 1 min nötig waren. Eine anschließende Trockenzentrifugation für 2 min bei 15000  $\times g$  gewährleistete die Entfernung des restlichen Waschpuffers. Das gereinigte Amplifikat löste sich durch die Zugabe von 30 µl Elutionspuffer und halbstündige Inkubation bei RT mit anschließender Zentrifugation bei 15000  $\times g$  für 1 min von der Säule. Im Folgenden wurde der DNA-Gehalt der gewonnenen Probe bestimmt. Diese konnte bei -20°C für mehrere Monate aufbewahrt werden.

### ➤ **Aufreinigung bei Doppel- und Mehrfachbanden im Gelbild**

Beim Vorliegen von unspezifischen Doppel- oder Mehrfachbanden gelang das Aufreinigen der PCR-Produkte mithilfe des QIAquick® Gel Extraction Kit. Bevor die Elektrophorese in einem 1%igen Agarosegel bei 110 V für 2 Stunden (h) durchgeführt werden konnte, musste das gesamte PCR-Produkt mit 5 µl LP versetzt werden. Das Mitführen von 2,5 µl HL ermöglichte es, die gewünschte Bande zu identifizieren. Nachdem das Gelstück mit dieser Bande unter UV-Licht ausgeschnitten worden war, wurde es mit dem dreifachen Volumen seines Gewichtes an QG-Puffer versetzt. Wie bei Anwendung des QIAquick® PCR Purification Kit war es bei verfärbtem Puffer nötig, zur Optimierung des pH-Wertes Natriumacetat hinzuzugeben. Nach dem Schmelzen des Gelstücks bei 50°C führte die Zentrifugation über eine QIAquick® Spinsäule für 1 min bei 15000 x g zur Adsorption der DNA an die Silica-Membran der Säule. Die Zentrifugation von 500 µl vorgewärmtem QG-Puffer gewährleistete die Entfernung der übrigen Agarose. Alle weiteren Schritte erfolgten analog zum Protokoll des QIAquick® PCR Purification Kit (Kapitel 4.5, S. 40).

### ➤ **Messung des DNA-Gehaltes**

Die Konzentration der DNA im Elutionspuffer konnte mithilfe des NanoDrop® ND-1000 Spektrophotometers bestimmt werden. Hierbei wurden 1,5 µl der gereinigten Probe auf den Sensor des Photometers pipettiert, wobei zuvor die gleiche Menge Elutionspuffer als Blank gedient hatte. Die Messung der Optischen Dichte (OD) erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD<sub>260</sub>), dem Absorptionsmaximum der Basen der DNA. Um den DNA-Gehalt in ng/µl zu ermitteln, verwendete die Gerätesoftware folgendes Gleichungsverhältnis:

$$1 \text{ OD}_{260 \text{ nm}} \triangleq 50 \text{ ng/}\mu\text{l dsDNA}$$

Für die Bestimmung des DNA-Reingehalts der Proben bildete die zugehörige Software den Quotienten aus OD<sub>260</sub> und OD<sub>280</sub>, da das Absorptionsmaximum der aromatischen AS von Proteinen bei einer Wellenlänge von 280 nm liegt. Ein niedrigerer Wert als 1,8 wies also auf eine Verunreinigung der Probe mit Proteinresten hin und erforderte eine erneute Aufreinigung. Eine reine DNA-Lösung lag bei einem Quotienten zwischen 1,8 und 2,0 vor.

#### 4.6 *In vitro* Rekombinationsreaktion

Durch die Mutagenese war das Plasmid mit dem rekombinanten TK-Gen in linearem Zustand generiert worden (Kapitel 4.4, S. 35). Im nächsten Schritt erfolgte die *in vitro*-Rekombination ebenfalls mithilfe des Geneart™ Site-Directed Mutagenesis System Kit. Die Reaktion fand auf Eis statt und wurde mit dem in Tab. 12 aufgezeigten Reaktionsgemisch durchgeführt. Das Volumen der eingesetzten Probe variierte je nach DNA-Gehalt des PCR-Produktes. Bei hohen DNA-Konzentrationen wurden 4 µl, bei niedrigen 14 µl DNA eingesetzt. Entsprechend war es nötig, die Menge an RNase-freiem Wasser anzupassen. Die Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA stoppte die Rekombinationsreaktion nach zehnminütiger Inkubation bei RT ab, und die Proben wurden bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gekühlt.

Tab. 12: Zusammensetzung des *in vitro*-Rekombinationsansatzes.

Lösung	Volumen [µl]	Endkonzentration
5 x Enzympuffer	4	1 x
10 x Enzymmix	2	1 x
Mutagenese-PCR-Produkt	x*	-
RNase-freies Wasser	14-x	-
<b>Gesamtvolumen</b>	20	-

\* 4 bis 14 µl, je nach DNA-Konzentration des Mutagenese-PCR-Produkts.

#### 4.7 Transformation in DH5α™-T1® *Escherichia coli*

Das Geneart™ Site-Directed Mutagenesis System Kit ermöglichte auch die Transformation der Plasmide in *E. coli*. Zunächst wurden die kompetenten Zellen für etwa 10 min auf Eis aufgetaut, je nach DNA-Konzentration des rekombinanten Plasmids mit 2 bis 8 µl des Rekombinationsansatzes beimpft und resuspendiert. Nun folgte eine zwölfminütige Inkubation auf Eis. Für den Hitzeschock, durch den die Bakterien die Plasmide aufnahmen, mussten diese für 30 Sekunden (s) auf 42°C erhitzt und anschließend für 2 min auf Eis abgekühlt werden. Nachdem der Ansatz in 250 µl 37°C warmem Super Optimal Broth with Catabolite Repression (SOC)-Medium resuspendiert und anschließend im Verhältnis 1:10 mit diesem verdünnt worden war, wurden die Bakterien auf 37°C warmen lysogeny broth (LB)-Platten mit Ampicillin (Amp) (Tab. 5, S. 33) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Hierbei kam es zur Selektion der *E. coli* durch das im Vektor enthaltene Gen für Amp-Resistenz.

## 4.8 Überprüfung der Mutagenese und Anlegen einer Vorkultur

Zur Amplifikation des rekombinanten Plasmids war es nötig, Bakterienkulturen anzulegen. Zudem dienten eine Kolonie-PCR sowie eine Plasmid-Mini-Präparation zur Beurteilung, ob die Mutation wie gewünscht eingefügt worden war.

### ➤ Kolonie-Polymerasekettenreaktion und Ansetzen der Vorkultur

Die Amplifikation des TK-Gens in der Kolonie-PCR gelang durch die Verwendung des Primerpaares M13F und M13R, deren Sequenzen in Tab. 13 dargestellt sind.

**Tab. 13: Sequenzen der Primer M13F und M13R.**

Primer	Sequenz (von 5' nach 3')
M13F ( <i>forward</i> )	GTA AAA CGA CGG CCA GT
M13R ( <i>reverse</i> )	CAG GAA ACA GCT ATG AC

Um ein Template zu generieren, wurden drei bis vier Bakterienkolonien je Agarplatte mit sterilen Pipettenspitzen von der Agarplatte gepickt und in vorbereiteten HotStar-PCR-Ansätzen resuspendiert (Tab. 14 und 15, S. 44). Eine Gelelektrophorese (Kapitel 4.4, S. 35) ermöglichte die Bestimmung der Molekülmasse des DNA-Fragments. Die Vorkultur (VK) entstand durch das Abwerfen der zum Picken verwendeten Pipettenspitze in einen Kolben mit 3 Milliliter (ml) LB-Medium mit Amp (LB<sub>amp</sub>) (Tab. 5, S. 33) und Schütteln über Nacht bei 37°C und 250 rpm.

**Tab. 14: Pipettierschema der HotStar-PCR.**

dNTP: Desoxyribonukleosidtriphosphat.

Taq: *Thermophilus aquaticus*.

Lösung	Volumen [µl]	Endkonzentration
Q-Solution (5 x)	10	1 x
PCR-Puffer (10 x)	5	1 x
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2	1 mM
dNTP-Mix (10 mM)	1	0,2 mM
<i>forward</i> -Primer M13F (10 µM)	1	0,2 mM
<i>reverse</i> -Primer M13R (10 µM)	1	0,2 mM
HotStar Taq <sup>TM</sup> (5 U/µl)	0,25	1,25 U
Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Lösung	24,75	-
gepickte Kolonie oder Plasmid-Midi- bzw. -Mini-DNA	-	-
<b>Gesamtvolumen</b>	45	-

Tab. 15: PCR-Bedingungen der HotStar-PCR.

Phase	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Anzahl der Zyklen
Initiale Aktivierung	95	15	1
Denaturierung	94	1	34
Hybridisierung	55	1	
Polymerisation	72	1,5	
Finale Hybridisierung	72	7	1
Kühlung	4	bis Probenentnahme	1

### ➤ Plasmid-Mini-Präparation

Die DNA konnte mithilfe des Plasmid Mini Kits gewonnen werden. 1,5 ml der VK, die in der Gelelektrophorese das Vorliegen eines TK-Amplifikats gezeigt hatte, wurden in ein Eppendorf-Gefäß überführt und bei 4000 x g für 1 min zentrifugiert. Der nächste Schritt bestand darin, den Überstand zu verwerfen und das Bakterienpellet in 100 µl Puffer P1 zu resuspendieren. Die Zugabe von 200 µl Puffer P2 und die fünfminütige Inkubation bei RT resultierten in der Lyse der Bakterienmembranen. Im Anschluss daran wurden 150 µl eiskalter Puffer P3 zu der Lösung pipettiert, diese 10 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 16000 x g für 10 min zentrifugiert. Hierbei fielen weiße Flocken aus Bakterienbestandteilen, chromosomaler DNA und Proteinen aus, während die lineare DNA in Lösung ging. Die Mischung des Überstands mit 900 µl 95%igem Ethanol sowie Zentrifugation bei 16000 x g und 4°C für 20 min führte zur Fällung der DNA. Ein weiterer Waschschrift mit 150 µl 70%igem Ethanol reinigte die Plasmide von den letzten störenden Substanzen. Die Pellets trockneten bei 37°C für 5 min. Nach der Vereinigung der Plasmide in 50 µl Aqua bidest. und der Bestimmung der DNA-Konzentration (Kapitel 4.5, S. 40) erfolgte die abermalige Amplifizierung der DNA mittels HotStar-PCR, die gelelektrophoretische Auftrennung der Fragmente (Kapitel 4.4, S. 35) und die Sequenzierung (Kapitel 4.9). Der Rest der VK wurde bis zur weiteren Bearbeitung bei 4°C gekühlt.

## 4.9 Sequenzierung

Auf Mini- und Midi-Präparation folgte die Auftragssequenzierung durch die Firma Eurofins MWG Operons (Ebersberg). Zur Herstellung des Sequenzieransatzes, der in Tab. 16 (S. 45) gezeigt ist, musste nach folgender Formel (S. 45) das einzusetzende DNA-Volumen bestimmt werden:

$$V [\mu\text{l}] = \frac{15 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 15 \mu\text{l}}{c (\text{DNA}) [\text{ng}/\mu\text{l}]}$$

Bei der Auswertung der Daten mithilfe des Open-Source Programmes MEGA 5.1 wurde das Alignment der erhaltenen AS-Sequenz mit der des WT 232 verglichen, um die mutagene Stelle sowie den T7-Promotor zu überprüfen und weitere unklare, unbekannte oder Resistenzmutationen durch die Kultivierung in *E. coli* auszuschließen. Zur Kontrolle von eventuellen AS-Veränderungen diente die Resistenzdatenbank nach Sauerbrei et al. (2016). Die Plasmid-DNA konnte für die folgende zellfreie Proteinsynthese verwendet werden, wenn keine, nur bekannte oder bereits im WT 232 vorhandene, Polymorphismus-assoziierte Veränderungen vorlagen.

**Tab. 16: Sequenzierungsansatz.**

Lösung	Volumen [ $\mu\text{l}$ ]
DNA-Template	x*
Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Lösung	13,5-x
Primer (M13F oder M13R)	1,5
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>15</b>

\* 4 bis 14  $\mu\text{l}$ , je nach DNA-Konzentration des PCR-Produkts.

#### 4.10 Anlegen einer Hauptkultur und Plasmid-Midi-Präparation

Bevor die Midi-Präparation zur Gewinnung von Plasmid-DNA durchgeführt werden konnte, musste eine Übernachtskultur (ÜK) und aus dieser eine Hauptkultur (HK) angelegt werden. Für die ÜK wurden 50  $\mu\text{l}$  der VK nach Mini-Präparation und Kontrolle des TK-Gens in ein Röhrchen mit 3 ml  $\text{LB}_{\text{amp}}$  überführt und über Nacht bei 37°C und 250 rpm geschüttelt. Die HK entstand durch die Beimpfung von 100 ml  $\text{LB}_{\text{amp}}$  mit 500  $\mu\text{l}$  der ÜK sowie Schütteln unter den gleichen Bedingungen.

Zur Gewinnung der rekombinanten DNA diente das NucleoBond® Xtra Midi Kit. Zuerst erfolgte die Zentrifugation der Hauptkultur bei 4°C und 5000 x g für 15 min. Nachdem der Überstand verworfen und die Bakterienpellets in 8 ml Resuspensionspuffer gelöst worden waren, wurde das Gemisch mit 8 ml alkalischem, salzarmem Lysepuffer versetzt. Während der fünfminütigen Inkubationszeit bei RT zerstörte SDS die Zellmembranen der Bakterien, während NaOH zur Denaturierung sowohl von Proteinen als auch von Plasmid- sowie chromosomaler DNA führte. In der Zwischenzeit wurde eine Säule mit 12 ml Equilibrierungspuffer kalibriert. Im nächsten Schritt kam es durch die Mischung des Lysats mit 8 ml Neutralisie-

rungspuffer zum Ausfallen weißer Flocken. Diese enthielten Proteine, Bakterienbestandteile und chromosomale DNA. Währenddessen regenerierte die Plasmid-DNA aufgrund des durch den Puffer verursachten neutralen pH-Wertes und ging in Lösung. Durch die Überführung der Suspension auf eine Säule trennte der Filter das Präzipitat von der Lösung, und die Säule adsorbierte die Plasmid-DNA. Nach der erneuten Kalibrierung von Säule und Filter mit 5 ml Equilibrierungspuffer wurde der Filter entfernt. Die etwas höhere Salzkonzentration in 8 ml Waschpuffer führte zur Reinigung der an die Säule gebundenen DNA, die anschließend mit 5 ml Elutionspuffer mit hoher Salzkonzentration von der Säule gelöst werden konnte. Die Hinzugabe von 3,5 ml Isopropanol ermöglichte die Fällung und Konzentration der DNA sowie die Entfernung der Salzurückstände. Nach gutem Mischen und Zentrifugieren bei 4°C und 16000 x g wurde der Überstand verworfen und die DNA durch 2 ml 70%iges Ethanol weiter gereinigt. Dieses wurde nach einem weiteren Zentrifugationsschritt ebenfalls verworfen und das DNA-Pellet trocknete bei RT für 30 min. Abschließend konnte es in 50 µl Aqua bidest. gelöst werden.

Nach der Bestimmung des DNA-Gehaltes (Kapitel 4.5, S. 40) wurde das TK-Gen durch eine HotStar-PCR (Tab. 14, S. 43 und Tab. 15, S. 44) amplifiziert, aufgereinigt (Kapitel 4.5, S. 40) und erneut sequenziert (Kapitel 4.9, S. 44). Die Plasmid-DNA lagerte bis zur weiteren Verwendung bei -20°C. Zudem wurde exemplarisch der restriktionsenzymatische Verdau von 2,6 Mikrogramm (µg) Plasmid-DNA mit der Mutation A93V in der TK durch je 1 µl der Enzyme EcoRI und XhoI in 4 µl Tango-Puffer durchgeführt, um zu zeigen, dass das TK-Gen in dem Vektor pIX3.0 vorlag.

#### 4.11 Zellfreie Synthese rekombinanter Proteine

Die Proteine mit den AS-Substitutionen Q15K, R32H, E43A, R89H, A93V, M121K, A156P, L170P und S181N wurden mithilfe des EasyXpress® Protein Synthesis Kit (Qiagen-Kit) hergestellt. Aufgrund der Einstellung der Produktion des Kitsystems erfolgte die Herstellung der übrigen Proteine, die die AS-Veränderungen R20C, E43D, G61E, A156V, R163G, P173Deletion, R216H, V238F, N244H, G264V, P268M, P269S, G271V, S276N, I326V, T183Stopp und N376Stopp enthielten, mit dem AccuRapid™ Cell-Free Protein Expression Kit (Bioneer-Kit). Beide Kitsysteme sind gekoppelte Transkriptions-Translations-Systeme, wobei das *E. coli*-Lysat alle für die Transkription und Translation notwendigen Bestandteile



wie Ribosomen, transfer-RNA, die T7- und eine *E. coli*-RNA-Pol beinhaltet. Die Pipettierschemata der Ansätze befinden sich in den Tab. 17 und 18.

**Tab. 17: Pipettierschema zur Proteinsynthese mittels Qiagen-Kit.**

Lösung	Volumen [ $\mu$ l]
Plasmid-Midi-DNA	x*
<i>E. coli</i> -Lysat	17,5
EasyXpress-Reaktionspuffer	20
RNAse-freies Wasser	12,5-x
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>50</b>

\*700 ng DNA

**Tab. 18: Pipettierschema zur Proteinsynthese mittels Bioneer-Kit.**

Lösung	Volumen [ $\mu$ l]
Plasmid-Midi-DNA	x*
AccuRapid™ <i>E. coli</i> -Extrakt	12
AccuRapid™ Mastermix	20,8
DEPC-Lösung	12,5-x
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>50</b>

\*600 ng DNA

Die Herstellung der Reaktionsansätze fand auf Eis statt. Bei der Proteinsynthese mittels Qiagen-Kit war es notwendig, 700 ng der durch Plasmid-Midi-Präparation gewonnenen DNA zu verwenden, bei Nutzung des Bioneer-Kits wurden 600 ng eingesetzt. Es folgte das Schütteln des Gemischs bei 37°C für 1 h bei Anwendung des Qiagen-Kits bzw. bei 30°C für 3 h bei Einsatz des Bioneer-Kits. Abschließend wurden die Proteinlösungen aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

#### 4.12 Herstellung kompetenter BL21(DE3) *Escherichia coli*

Nachdem sich gezeigt hatte, dass für die Analyse der Phosphorylierungsaktivität mittels HPLC/UV und LC/MS/MS eine größere Menge an TK nötig ist, als durch zellfreie Synthese (Kapitel 4.11, S. 46) gewonnen werden konnte, wurde eine Methode zur *in vivo* Proteinsynthese erarbeitet. Hierfür mussten zuerst kompetente BL21(DE3) *E. coli* hergestellt werden, da diese im Gegensatz zu DH5 $\alpha$ ™-T1® *E. coli* eine T7-RNA-Pol besitzen und somit zur *in vivo* Proteinexpression fähig sind (Studier und Moffatt 1986). Im ersten Schritt wurde eine LB-Agarplatte ohne Amp mit noch vorrätigen Bakterien beimpft. Diese wuchsen über Nacht bei 37°C, sodass eine Kolonie gepickt und in eine VK überführt werden konnte. Wenn die OD bei 600 nm einen Wert zwischen 0,25 und 0,5 erreicht hatte, wurde die VK in ein vorgekühltes Falcon gegeben und für 10 min auf Eis gekühlt. Nach der anschließenden Zentrifugation bei 4696 x g und 4°C für 10 min konnte der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in 20 ml 100 mM Calciumchlorid resuspendiert werden. Danach wurde die Suspension abermals für 20 min auf Eis inkubiert, bei denselben Bedingungen zentrifugiert und wiederum der

Überstand verworfen. Nach Zugabe von 4 ml 100 mM Calciumchlorid inkubierte die Lösung für weitere 2 h auf Eis. Anschließend wurde tropfenweise 140 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) hinzugegeben, wobei darauf zu achten war, dass sich die Bakteriensuspension gleichmäßig mit dem DMSO mischte. Danach inkubierte der Ansatz für weitere 15 min auf Eis. Es erfolgte abermals die vorsichtige Zugabe von 140 µl DMSO. Die kompetenten Bakterien wurden in Aliquots á 25 µl bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Um zu gewährleisten, dass durch die Versuchsdurchführung ohne Ampicillin keine mikrobiellen Verunreinigungen in den Aliquots mit kompetenten BL21(DE3) *E. coli* entstanden waren, wurde eine Charge Bakterien auf einer LB<sub>amp</sub>-Platte ausgestrichen. Waren nach Inkubation über Nacht bei 37°C keine Kolonien gewachsen, konnten die *E. coli* für die weiteren Versuche verwendet werden.

#### 4.13 *In vivo* Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine

Nun mussten die rekombinanten Plasmide in die kompetenten BL21(DE3) *E. coli* transformiert werden. Hierfür war es nötig, 200 ng Plasmid-Midi-DNA auf 25 µl tiefgefrorene, kompetente Bakterien zu geben. Nach zehnminütiger Inkubation auf Eis kam es durch den Hitzeschock bei 42°C für 60 s zur Aufnahme des Plasmids in die *E. coli*. Nachdem die Bakterien erneut für 1 min auf Eis gekühlt worden waren, wurden 500 µl auf 37°C vorgewärmtes SOC-Medium zur Lösung gegeben. Anschließend vermehrten sich die Bakterien schüttelnd für 1 h bei 37°C und wuchsen über zwei Nächte auf einer LB<sub>amp</sub>-Agarplatte bei RT. Im Anschluss daran wurde eine Kultur gepickt, das TK-Gen durch eine HotStar-PCR (Tab. 14, S. 43 und Tab. 15, S. 44) überprüft und eine VK hergestellt (Kapitel 4.8, S. 43). Nach abermaligem Schütteln bei 250 rpm und 37°C über Nacht konnten 150 ml HK mit 2,5 ml der VK beimpft werden. Wenn die OD der Lösung bei 600 nm einen Wert zwischen 0,5 und 0,7 erreicht hatte, vermehrten sich die Bakterien exponentiell und exprimierten Chaperone. Diese bauten fehlgefaltete Proteine ab. Deshalb wurde zu diesem Zeitpunkt Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) bis zu einer Endkonzentration von 0,3 mM zu der HK gegeben. Die Substanz stellt einen Aktivator des Lactose-Operons von *E. coli* dar und induziert somit die Proteinsynthese. Nach der schüttelnden Inkubation über Nacht bei 180 rpm und 22°C wurde die Zellsuspension bei 4°C und 4500 x g für 20 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend musste das Bakterienpellet bei -80°C eingefroren, 15 min auf Eis aufgetaut und in 1,5 ml Puffer W aus dem Strep-Tag® Protein Purification Buffer Set resuspendiert werden. Die Abgabe von neun Ultraschallimpulsen von je 10 s bei 300 Watt (W) mit 10 s Pause zwischen den Im-

pulsen führte zur Zerstörung der bakteriellen Membranen und zur Freisetzung der bis zu diesem Schritt intrazellulär vorliegenden TK. Im Anschluss daran erfolgte die Zentrifugation bei 2000 x g für 15 min bei 4°C. Der Überstand, in dem die TK-Proteine gelöst waren, wurde über Nacht bei 4°C gelagert.

Die Aufreinigung der rekombinanten Enzyme gelang mittels Gravity flow *Strep-Tactin*<sup>®</sup> Sepharose<sup>®</sup> Säulen. Zunächst musste die Säule mit 2 ml Puffer W equilibriert werden. Währenddessen wurde der Überstand mit den TK-Proteinen bei 2100 x g und 4°C für 5 min zentrifugiert und anschließend auf die Säule gegeben. Die TK-Proteine adsorbierten durch ihren Strep-tag an die Säule, da diese das synthetische *Strep-Tactin*<sup>®</sup> enthielt. Dieses ist ein Derivat des natürlichen Strep-tag-Substrats Streptavidin. Die Entfernung von unspezifischen bakteriellen Proteinen wurde durch fünf aufeinanderfolgende Waschschriffe mit jeweils 1 ml Puffer W gewährleistet. Die Eluierung der TK-Proteine erfolgte in sechs Elutionsschritten mit jeweils 0,5 ml Puffer E. Dieser enthielt Desthiobiotin, welches mit *Strep-Tactin*<sup>®</sup> um die Binde-tasche des Strep-tags konkurrierte und somit die rekombinanten TK-Proteine von der Säule löste. Bis zur weiteren Verwendung wurde das Eluat in Aliquots bei 4°C gelagert.

#### 4.14 Bradford-Test

Der Bradford-Test wurde angewandt, um die Proteinkonzentration zu bestimmen. Hierbei wird auf photometrischer Basis der Proteingehalt von Lösungen gemessen. Im Bradford-Reagenz ist der rote Farbstoff Coomassie Brilliant Blue enthalten, der sein Absorptionsmaximum bei 465 nm hat. Kommt das Molekül mit Proteinen in Berührung, bilden diese Komplexe und das Reagenz verfärbt sich blau. Zudem verschiebt sich das Absorptionsmaximum zu 595 nm.

Für diesen Test war die Erstellung einer Standardkurve notwendig. Ausgehend von einer Rinderserumalbumin (BSA)-Stammlösung mit einer Konzentration von 25 µg/ml wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt. Die Konzentration in den einzelnen Verdünnungsstufen sind aus Tab. 19 (S. 50) ersichtlich. Die Standardlösungen und die Proteine in den Verdünnungen 1:2000 und 1:3000 (zellfrei hergestellte, nicht aufgereinigte Proteine) bzw. 1:50 und 1:100 (*in vivo* synthetisierte, aufgereinigte Proteine) wurden zu je 100 µl in Doppelansätzen in eine 96-Well-Platte pipettiert und mit 100 µl Bradford-Reagenz versetzt. Als Blank dienten 100 µl Aqua bidest.

**Tab. 19: Konzentrationen der BSA-Standardreihe.**

Standard	BSA-Konzentration [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ]
S1	2,5
S2	5,0
S3	7,5
S4	10,0
S5	12,5
S6	15,0

Nachdem die Lösungen gut gemischt und alle Luftblasen entfernt worden waren, wurde die OD bei einer Wellenlänge von 550 nm bestimmt, welche der Konzentration der verdünnten Lösungen in  $\mu\text{g}/\text{ml}$  entsprach. Anhand der Standardkurve konnte beurteilt werden, ob die Messwerte aussagekräftig waren. Zeigte sich eine zu große Streuung der Werte der Standardkurve, musste diese erneut hergestellt und der Test wiederholt werden. Die Konzentration der unverdünnten Ausgangslösungen in  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  berechnete sich folgendermaßen:

$$c [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \frac{c [\mu\text{g}/\text{ml}] \times \text{Verdünnungsfaktor}}{1000}$$

#### 4.15 Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

Eine Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit anschließendem Western Blot ermöglichte die Kontrolle des Molekulargewichts der synthetisierten Proteine. Hierfür wurde ein 12%iges SDS-Gel verwendet, das aus einem Sammel- und einem Trenngel bestand, welche sich in Ionenstärke, pH-Wert und Porengröße unterschieden. Das im Gel enthaltene SDS maskierte die Ladungen der Proteine, sodass diese Richtung Anode wanderten, woraufhin es im Sammelgel zur Konzentration und im Trenngel zur Auftrennung der Proteine kam. Die Zusammensetzung dieser Gele ist in Tab. 20 (S. 51) aufgeführt.

Bevor für den anschließenden Western Blot 60  $\mu\text{g}$  (zellfrei synthetisierte, nicht aufgereinigte Proteine) bzw. 0,5  $\mu\text{g}$  (*in vivo* exprimierte, aufgereinigte Proteine) der Proben in die Taschen des Gels appliziert werden konnten, mussten diese mit 2,5  $\mu\text{l}$  Pierce<sup>TM</sup> Lane Marker Reducing Sample Buffer versetzt und die Mischung mit Aqua bidest. auf ein Volumen von 12,5  $\mu\text{l}$  aufgefüllt werden. Wurde anschließend statt Western Blot eine Coomassie-Färbung durchgeführt, wurden 20  $\mu\text{l}$  der Aufreinigungsfractionen zu 2,5  $\mu\text{l}$  Sample Buffer gegeben. Da die erste Waschfraktion eine äußerst hohe Proteinkonzentration enthielt, war in diesem Fall die

Verwendung von 2 µl ausreichend. Die Erhitzung der Ansätze für 5 min bei 95°C führte zur Zerstörung der Wasserstoffbrückenbindungen und damit zum Schmelzen der Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine. So lagen diese in linearer Form vor und konnten durch das Gel wandern. Nach dem Auftragen der Ansätze erfolgte die Elektrophorese bei 100 V für 2 h. Freie Taschen waren mit Probenpuffer gefüllt, damit die Proben gerade liefen. Als Molekulargewichtsmarker diente der PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, als Laufpuffer der in Tab. 4 (S. 32) beschriebene Laufpuffer in einfacher Konzentration.

**Tab. 20: Zusammensetzung des 12,5%igen SDS-Gels.**

Gel	Lösung	Volumen [µl]
Trenngel	Acrylamid	2000
	Aqua bidest.	1600
	4x Trenngelpuffer	1200
	10 % Ammoniumpersulfat (APS)	21,5
	Tetramethylenethyldiamin (TEMED)	5,5
Sammelgel	Acrylamid	260
	Aqua bidest.	930
	4x Sammelgelpuffer	400
	10 % APS	20,5
	TEMED	2,0

#### 4.16 Visualisierung der Proteine

Zunächst wurden sowohl aufgereinigte als auch nicht aufgereinigte Proteine mittels Western Blot detektiert. Im ersten Schritt wurden die Proteine aus dem Gel mittels Blotapparatur auf eine Membran übertragen. Diese Apparatur setzte sich aus einer schwarzen Lochmembran (Minuspol), einem Schwämmchen, einem Filterpapier, einer Nitrocellulosemembran, dem SDS-Gel, einem weiteren Filterpapier, einem weiteren Schwämmchen und einer weißen Lochmembran (Pluspol) zusammen. Das Gel wurde über Nacht bei 12 V unter Verwendung des Blotpuffers aus Tab. 4 (S. 32) geblottet. Hierbei entstand senkrecht zum Gel ein elektrisches Feld, wodurch die Proteine und der Marker aus dem Gel auf die Nitrocellulosemembran wanderten und aufgrund hydrophober Wechselwirkungen dort haften blieben. Ein Eisblock, der ebenfalls in der Blotvorrichtung steckte, kühlte die Apparatur.

Nach Abschluss des Blots wurden die Proteine sichtbar gemacht. Zunächst musste die Nitrocellulosemembran für 1 h in der in Tab. 4 (S. 32) beschriebenen Blockierungslösung geschüttelt werden, um unspezifische Bindungsmöglichkeiten zu inhibieren. Anschließend inkubierte die Membran abermals für 1 h in dem 1:500 verdünnten, spezifisch gegen das TK-Protein

gerichteten HSV-1 Thymidine Kinase (vN-20) goat polyclonal IgG. Um nicht gebundene AK zu entfernen, folgte dreimaliges Waschen der Membran mit Tris-Buffered-Saline mit Tween (TBST-Puffer). Danach wurde die Membran wiederum für 1 h mit dem Sekundär-AK R1317 AP anti goat IgG (H&L) AP in einer Verdünnung von 1:2000 schüttelnd inkubiert, der gegen den F<sub>c</sub>-Teil des Primär-AK gerichtet und an das Enzym Alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt war. Nach erneutem Waschen reagierte die AP auf der Membran für etwa 5 min im Dunkeln mit einer halben Tablette Nitroblau-Tetrazoliumchlorid/5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (NBT/BCIP) in 7,5 ml A. bidest. Hierbei erfolgte eine Redoxreaktion, durch die NBT sich zu einem sichtbaren, blauen Farbstoff entwickelte, der die Lage der Proteine auf der Nitrocellulosemembran anzeigte. Nach Trocknung der Membran wurde durch Abgleich mit dem Marker die Größe der Proteine festgestellt. Darüber hinaus erfolgte der Nachweis des 6x-Histidin-tags (His<sub>6</sub>-tag) der rekombinanten Proteine exemplarisch für den WT 232. Dies gelang mit demselben Protokoll unter Verwendung des Pierce 6x-His Epitope Tag Antibody in der Verdünnung 1:2000 als Primär-AK. Als Sekundär-AK diente der Donkey anti-Mouse IgG Secondary Antibody, HRP conjugate in der Verdünnung 1:5000, an den eine Peroxidase gekoppelt war. Dementsprechend wurde Immobilon<sup>TM</sup> Western Chemiluminescent HRP Substrate zur Detektion verwendet, das mittels Chemolumineszenz visualisiert werden konnte. Zusätzlich wurde die Reinheit der *in vivo* exprimierten Proteine mittels Coomassie-Färbung beurteilt. Coomassie-Brillant-Blau ist ein Triphenylmethanfarbstoff, der sich unspezifisch an die basischen Seitenketten von Proteinen anlagert und auf diese Weise alle Proteine sichtbar macht. Dabei inkubierte das SDS-Gel für mindestens 1 h in 25 ml Quick Coomassie<sup>TM</sup> Färbelösung (Tab. 6, S. 33), nachdem es bei 100 W für 15 s in der Mikrowelle erhitzt worden war. Anschließend wurde ungebundener Farbstoff mittels Aqua bidest. entfernt. Nun konnten sowohl TK- als auch unspezifische *E. coli*-Proteine detektiert und somit die Reinheit der TK beurteilt werden.

#### 4.17 DiviTum<sup>TM</sup>-Assay

Das DiviTum<sup>TM</sup>-Testsystem ermöglichte unter Modifizierung des Herstellerprotokolls (Sauerbrei et al. 2012) die Einteilung der Phosphorylierungsaktivität der TK in die qualitativen Kategorien positiv, schwach positiv und negativ. Der Test ist ein nicht radioaktiver *in vitro*-ELISA, bei dem BrdU als Substrat der rekombinanten TK fungiert.

Die Durchführung des Versuchs fand auf Eis statt. Um die lyophilisierten Stoffe zu lösen, wurden Reagenz A (Reag A) mit 10 ml und die Reagenzien B (Reag B) mit BrdU bzw. mit Dithiothreitol (DTT) mit 1,5 ml des Reaktionspuffers versetzt. Daraufhin wurden 100 µl Reag B mit BrdU und 1 ml Reag B mit DTT zu Reag A gegeben, sodass eine BrdU-Endkonzentration von 1% vorlag. Der nächste Schritt bestand in der Herstellung verschiedener Verdünnungsstufen der Proteine ausgehend von einer Proteinkonzentration von 100 ng/ml. Diese sind aus Tab. 21 ersichtlich. Hierfür wurden die zellfrei synthetisierten Proteine verwendet (Sauerbrei et al. 2012).

**Tab. 21: Verdünnungsstufen der Proteine für den DiviTum<sup>TM</sup>-Test mit nicht aufgereinigten Proteinen.**

Die für die Auswertung entscheidenden Verdünnungen sind fett gedruckt.

Kitsystem	Verdünnung	Proteinmenge [ng]
EasyXpress® Protein Synthesis Kit (Qiagen-Kit)	1:50	180,00
	1:200	45,00
	1:800	11,25
	<b>1:3200</b>	<b>2,81</b>
	1:12800	0,78
AccuRapid <sup>TM</sup> Cell-Free Protein Expression Kit (Bioneer-Kit)	1:3200	2,81
	1:12800	0,78
	<b>1:51200</b>	<b>0,18</b>
	1:204800	0,04
	1:819200	0,01

Jeweils 10 µl der verdünnten Proteine wurden als Doppelbestimmung zu 100 µl Reaktionsgemisch in die Kavitäten der mit poly-A-Schwänzen beschichteten Mikrotiterplatte pipettiert. Hierbei war es nötig, die PK WT 232, die NK pIX3.0 und die RK Q250Stopp in den entsprechenden Verdünnungsstufen mitzuführen. Als Blank dienten 10 µl Reaktionspuffer. Der Ansatz inkubierte für  $18 \pm 1$  h bei 32°C. Bei diesem Schritt katalysierte die TK, sofern sie aktiv war, die Reaktion von BrdU zu BrdU-MP. Weitere Kinasen im Reaktionsgemisch ermöglichten die Reaktion zum DP und zum TP, wobei DNA-Synthese zur Immobilisierung des BrdU-TP an die poly-A-Schwänze führte. Für diesen Vorgang waren eine im Kit enthaltene reverse Transkriptase und ein dNTP-Mix essentiell. Im Anschluss daran wurde die Mikrotiterplatte dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Es folgte die Zugabe von 100 µl Enzymlösung pro Well, ein erneuter Inkubationsschritt für 1 h bei 32°C und abermals dreimaliges Waschen. Während dieser Zeit band ein in der Lösung enthaltener, an AP gekoppelter AK an die BrdU-Reste der zuvor synthetisierten DNA. Nun wurden 120 µl Substrat in jede Kavität gegeben. Während der Inkubation bei 32°C spaltete die AP einen Phosphatrest von dem im Substrat

enthaltenen farblosen p-Nitrophenylphosphat (pNPP) ab. Durch diese Reaktion entstand das schwach gelbe p-Nitrophenol. Die Farbveränderung konnte photometrisch durch die Bestimmung der Extinktion bei 405 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm nach 30 min sowie nach 3 h Inkubationszeit gemessen werden.

Für die Berechnung der Enzymaktivität war es nötig, die Mittelwerte (MW) der Doppelbestimmungen sowie den MW der beiden Blankmessungen zu bilden. Das Produkt aus der Differenz dieser Werte und dem Verdünnungsfaktor ergab die Enzymaktivität in der Einheit DU/l. Aus dem Ergebnis der Aktivität der NK, dem Vektor pIX3.0 ohne TK-Gen-Insert, wurde in Anlehnung an bereits durchgeführte Untersuchungen (Sauerbrei et al. 2012) ein Cut-off definiert, welcher bei der fünffachen Aktivität der NK zuzüglich deren Standardabweichung lag. Die Kriterien für die Bewertung der Phosphorylierungsaktivität sind in Tab. 22 dargestellt. Für die Einschätzung der TK-Aktivität war der MW aus Dreifachbestimmungen nach 3 h Inkubationszeit entscheidend, da zu diesem Zeitpunkt bereits genügend BrdU phosphoryliert worden war, um aussagekräftige Werte für die Aktivität der TK zu erhalten, es aber noch nicht zu Messbereichsüberschreitungen gekommen war (Sauerbrei et al. 2012).

**Tab. 22: Kriterien zur Einteilung der TK-Aktivität mittels DiviTum<sup>TM</sup>-Test.**

Kriterium	Bewertung der TK-Aktivität	Klassifikation der AS-Substitution
$\leq$ Cut-off	negativ	Resistenzmutation
$>$ Cut-off und $\leq 10\%$ WT 232	schwach positiv	Polymorphismus mit schwach positiver Aktivität
$> 10\%$ WT 232	positiv	Natürlicher Polymorphismus

Um zu zeigen, dass die TK auch nach der Aufreinigung noch aktiv war, und um schwach positive Aktivitäten näher zu charakterisieren, wurde der DiviTum<sup>TM</sup>-Test zusätzlich unter Verwendung der aufgereinigten Proteine durchgeführt. Dies erfolgte wie oben beschrieben. Da in diesem Fall jedoch kein Proteingemisch, sondern reine TK vorlag, genügte die Verwendung von nur 11,25 pg Protein. Um den auswertbaren Bereich abzudecken, wurden zusätzlich fünf Verdünnungen in Doppelbestimmung getestet (Tab. 23, S. 55). Die Mitführung eines nicht aufgereinigten WT 232-Protein diente zum Vergleich der Ergebnisse. Hierbei musste nach 30 Minuten die Verdünnungsstufe 1:51200 (0,18 ng Protein) untersucht werden, da nur in diesem Bereich auswertbare Ergebnisse für aufgereinigtes und nicht aufgereinigtes WT-Protein erzielt werden konnten.



**Tab. 23: Verdünnungsstufen der Proteine für den DiviTum™-Test mit aufgereinigten Proteinen.**

Die für die Auswertung entscheidende Verdünnung ist fett gedruckt.

Verdünnung	Proteinmenge [pg]
1:51200	18,00
1:819200	11,25
1:1638400	5,63
<b>1:3276800</b>	<b>2,81</b>
1:6553600	1,41
1:13107200	0,70

#### 4.18 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie/UV-Spektrometrie

Mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie/Ultravioletspektroskopie (HPLC/UV) sollte die Phosphorylierungsaktivität der rekombinanten TK-Proteine sowohl gegenüber ACV als auch gegenüber dT bestimmt werden. Darüber hinaus war es möglich, den Umsatz von ATP zu ADP zu quantifizieren. Zuerst inkubierten 0,1 µg/µl aufgereinigte, rekombinante Proteine bei 37°C für 18 ± 1 h in modifiziertem Phosphorylierungspuffer (Tab. 4, S. 32) nach Pilger et al. (1999). Wenn die TK aktiv war, phosphorylierte sie nun ACV zu ACV-MP oder dT zu dTMP. Danach wurde die Lösung im Verhältnis 1:24 mit Puffer A (Tab. 4, S. 32) verdünnt, wobei für die Auftrennung der Analyten in der Anionenaustauscher-Säule NUCLEOSIL® 4000-7 PEI 200 µl der Lösung benötigt wurden. Bei dieser Säule bestand die stationäre Phase aus Siliciumdioxid mit kovalent gebundenem Polyethylenimin, sodass sich in wässriger Lösung ein Polykation bildete. Dieses adsorbierte reversibel negative Ladungen der Analyten. Die mobile Phase bildete ein Salzgradient aus KCl (Puffer B, Tab. 4, S. 32), sodass die Analyten je nach Stärke der Bindung nach spezifischer Dauer von der Säule verdrängt wurden. Die Charakteristika des Gradienten sind aus Tab. 24 ersichtlich.

**Tab. 24: Konzentrationen des Salzgradienten.**

Zeitraum	KCl-Konzentration [M]
0,0 bis 5,0 min	0,075
5,0 bis 6,0 min	1,080
6,0 bis 7,5 min	1,425
7,5 bis 8,5 min	0,075

Die Messung fand bei einem Druck von 150 bar, einer Flussgeschwindigkeit von 1,5 ml/min und einer Temperatur von 25°C statt. Die Analyten wurden anschließend mittels UV-Spektroskopie bei einer Wellenlänge von 260 nm detektiert, da sowohl ATP und ADP (Kraft

1976) sowie ACV und ACV-MP (Malarte et al. 2012) als auch dT und dTMP (Malarte et al. 2012) in diesem Bereich ihr Absorptionsmaximum haben. Die Analyse jeder Probe erfolgte in Dreifachbestimmung, wobei zur Auswertung die Mittelwerte der Ergebnisse herangezogen wurden. Um zu verhindern, dass Rückstände vorheriger Messungen die Werte verfälschten, wurden zwischen den Messungen jeweils drei Leerläufe mit reinem Puffer A durchgeführt. Zur quantitativen Analyse der Chromatogramme diente die Software ValueSolution Chem-Software, die die prozentualen Anteile der einzelnen Peakflächen (Area%) durch Integration ermittelte. Anschließend wurde die Konzentration der Analyten kalkuliert. Die folgende Formel steht exemplarisch für die Berechnung des ACV-Gehaltes:

$$c(\text{ACV}) [\text{mM}] = \frac{\text{Area\% (ACV)} \times 2 \text{ mM}}{\text{Area\% (ACV)} + \text{Area\% (ACV-MP)}}$$

Entsprechend kann die Konzentration an ACV-MP, dT bzw. dTMP und ATP bzw. ADP berechnet werden. Bei der Berechnung des ATP- und ADP-Gehaltes muss allerdings darauf geachtet werden, anstelle der ACV-Konzentration von 2 mM mit der eingesetzten ATP-Konzentration von 5 mM zu rechnen. Auf Basis der so erzielten Ergebnisse wurden Cut-off-Werte zur Einteilung der TK-Aktivität gegenüber ACV und dT definiert, die den Grenzwerten des DiviTum<sup>TM</sup>-Tests vergleichbar waren (Tab. 25):

**Tab. 25: Kriterien zur Einteilung der TK-Aktivität gegenüber ACV bzw. dT mittels HPLC/UV.**

Konzentration an ACV-MP oder dT	Bewertung der TK-Aktivität
0,0 mM	negativ
> 0,0 mM und ≤ 10 % WT 232	schwach positiv
> 10 % WT 232	positiv

Anschließend konnte aus der vergleichenden Betrachtung der Ergebnisse für dT und ACV geschlossen werden, ob es sich bei Resistenzmutationen um TK<sup>-</sup>, TK<sup>R</sup>- oder TK<sup>A</sup>-Mutanten handelte: Von einer TK<sup>R</sup>-Mutante konnte ausgegangen werden, wenn sowohl die Phosphorylierungsaktivität gegenüber dT als auch gegenüber ACV im schwach positiven Bereich lag. War die TK-Aktivität gegenüber dT positiv, gegenüber ACV aber negativ, war das Protein mit dem entsprechenden AS-Austausch als TK<sup>A</sup>-Mutante zu werten. Eine TK<sup>-</sup>-Mutante lag vor, wenn die Aktivität gegenüber beiden Substraten negativ war. Zur Verdeutlichung ist dieser Sachverhalt in Tab. 26 (S. 57) dargestellt.

**Tab. 26: Einteilung der Resistenzmutanten in die Kategorien TK<sup>-</sup>, TK<sup>R</sup> und TK<sup>A</sup>.**

Art der Resistenzmutation	Aktivität gegenüber dT	Aktivität gegenüber ACV
TK <sup>-</sup>	negativ	negativ
TK <sup>R</sup>	schwach positiv	schwach positiv
TK <sup>A</sup>	positiv	negativ

Die katalytische Konstante ( $k_{\text{cat}}$ ) gibt an, welche Menge Substrat pro s von einem Enzym phosphoryliert wird. Diese konnte für den Umsatz von ACV unter Einbeziehung der eingesetzten Stoffmenge an TK näherungsweise durch folgende Formel berechnet werden:

$$k_{\text{cat}} [1/\text{s}] = \frac{c(\text{ACV-MP}) [\text{mM}] \times 200 \mu\text{l}}{18 \times 3600 \text{ s} \times 0,456 \text{ nmol}}$$

Die katalytische Konstante für dT und ATP kann berechnet werden, indem die Konzentration an dTMP bzw. ADP anstelle der Konzentration von ACV-MP in die Formel eingesetzt wird. Adenosintriphosphat stellt das Cosubstrat der TK bei der Synthese von ACV-MP dar, wobei bei jedem Katalysezyklus eine Phosphatgruppe auf ACV übertragen wird. Deshalb war zu erwarten, dass sich die Ergebnisse für  $k_{\text{cat}}$  von ACV/dT und ATP in etwa entsprachen.

#### 4.19 Flüssigchromatographie/Massenspektrometrie

Auch bei der Anwendung von Flüssigchromatographie/Triple-Quadrupolmassenspektrometrie (LC/MS/MS) war es nötig, aufgereinigte Proteine zu verwenden, die, wie in Kapitel 4.18 (S. 55) beschrieben, in Phosphorylierungspuffer inkubierten. Anschließend wurde das Gemisch mittels Flüssigchromatographie (LC) separiert. Bevor die Analyten in die LC-Säule Multohigh 100 RP injiziert werden konnten, musste diese für 5 min mit Equilibrierungspuffer (Tab. 4, S. 32) kalibriert werden. Daraufhin wurde die flüssige Phase in der Säule auf 100% Methanol umgestellt und 10  $\mu\text{l}$  der Probe injiziert. Bei der Säule handelte es sich um eine reverse-phase C18-Säule, in der die stationäre Phase aus Kieselgel bestand, welches mit C18-Ketten beschichtet war. Durch hydrophobe Wechselwirkungen adsorbierten die Analyten an die Säule. Abhängig von der Stärke der Bindung lösten sie sich nach spezifischer Dauer durch das hydrophile Lösungsmittel Methanol ab, mit dem die Säule mit 300  $\mu\text{l}/\text{min}$  kontinuierlich durchspült wurde. Für die Messung des Verhältnisses zwischen Masse und Ladung ( $m/z$ ) im Massenspektrometer mussten die aufgetrennten Stoffe nun mittels Elektronensprayionisation (ESI) ionisiert werden. Bei dieser Methode wurde die zu analysierende Flüssigkeit über eine

Kapillare in ein feines Filament geleitet. Durch das Anlegen einer Hochspannung gelangten je nach Polarität der Spannungsquelle Anionen oder Kationen in die Flüssigkeit. Hierbei erreichte die Lösung die sogenannte Raleigh-Grenze, bei der die elektrostatische Abstoßung die Oberflächenspannung des Lösungsmittels überstieg, wodurch das Lösungsmittel verdampfte. Infolgedessen stieg die Ionendichte auf der Oberfläche der Analyten, sodass sie desorbierten. Diese sogenannte Coulomb-Explosion bewirkte die Bildung eines geladenen Sprays, wobei ACV positiv und ACV-MP negativ ionisiert wurde (Hesse et al. 2012). Die Parameter der ESI sind in Tab. 27 ersichtlich.

**Tab. 27: Einstellung der Parameter bei ESI.**

Parameter	Einstellung
Spannung	4500 V
Temperatur	450°C
Kollisionsgas	Medium
Ionenquellengas 1	30 Pounds per Square Inch (PSI)
Ionenquellengas 2	60°C
Gasvorhang	45 PSI

Durch die so entstandene Ladung wurde das Spray ins Massenspektrometer gesogen. Dieses bestand aus drei Kammern. In der ersten wurden die Ionen nach  $m/z$  selektiert. Die zweite Kammer fragmentierte die Analyten durch Stickstoff, sodass in der dritten Kammer die Bestimmung des  $m/z$  der spezifischen Fragmente stattfinden konnte. Anschließend wurde die Signalintensität der Ionen mit dem gewünschten  $m/z$  in Zählungen pro s (CPS) mittels der Software Analyst 1.4 gemessen. Als externe Standards dienten die chemisch verwandten Stoffe Guanosin für ACV und Guanosin-MP für ACV-MP.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Site-directed mutagenesis

Um zu überprüfen, ob die Methyl- und Mutagenese-PCR (Kapitel 4.4, S. 35) erfolgreich gewesen war, wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Abbildung 15 zeigt exemplarisch das Gelbild der elf mutagenen Plasmide mit den AS-Substitutionen A93V, E43D, M121K, A156V, T183Stopp, R216H, N244H, P268M, P269S, I326V und N376Stopp. Die Lage der Banden bei 4081 bp kommt durch den Vektor pIX3.0 mit 2697 bp, die TK mit 1131 bp (Wagner et al. 1981) und die Adaptersequenzen mit 253 bp zustande. Die Adaptersequenzen bestehen aus His<sub>6</sub>- (148 bp) sowie Strep-tag (105 bp).

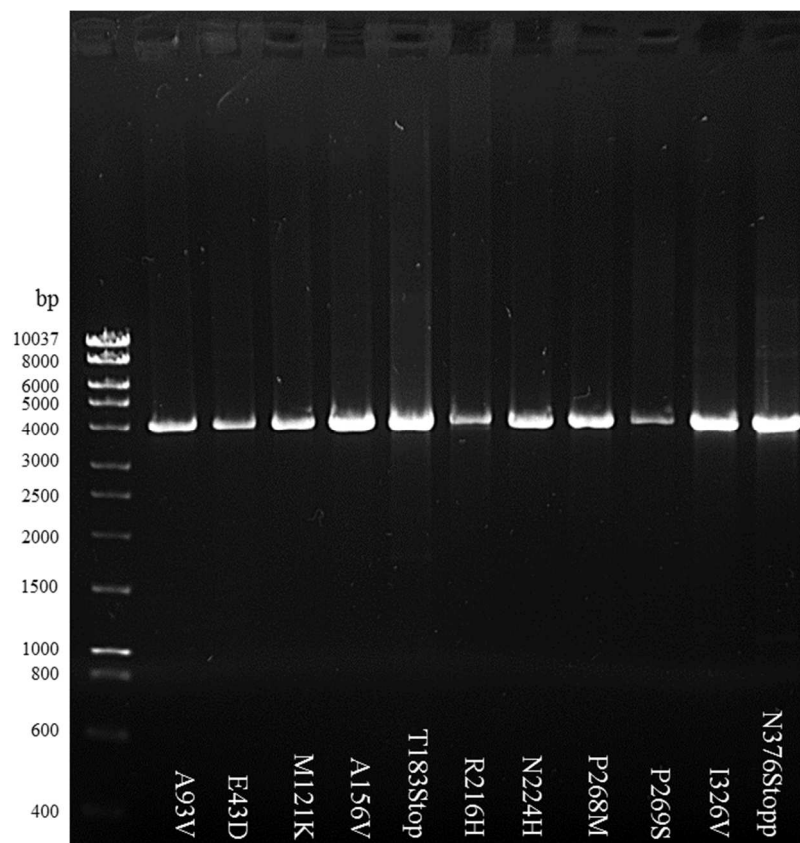


Abb. 15: Elektrophoresebild nach Methyl- und Mutagenese-PCR.

Die differente Stärke der Banden ist durch die unterschiedliche Menge an Amplifikat nach der PCR zu erklären. Diese konnte jedoch in der Rekombinationsreaktion (Kapitel 4.6, S. 42) durch den Einsatz unterschiedlicher Volumina an PCR-Produkt ausgeglichen werden.

## 5.2 Anzucht in *Escherichia coli*

Nach der Herstellung der kompetenten BL21(DE3) *E. coli* (Kapitel 4.12, S. 47) wurde ein Aliquot der Bakterien auf einer LB<sub>amp</sub>-Platte ausplattiert. Da nach der Inkubation über Nacht bei 37°C keine Kolonien gewachsen waren, war davon auszugehen, dass keine anderweitige mikrobielle Verunreinigung vorlag, die die folgenden Versuche beeinflussen konnte. Die kompetenten BL21(DE3) *E. coli* wurden deshalb für die weiteren Experimente verwendet.

Bei den anschließenden Versuchen wurden die Plasmide zur Midi-Präparation in DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup>-T1<sup>®</sup> *E. coli* (Kapitel 4.8, S. 43) und die Plasmide zur *in vivo* Proteinexpression in BL21(DE3) *E. coli* (Kapitel 4.13, S. 48) vermehrt. Zur Sicherstellung der TK-Expressierung erfolgte nach dem Picken einiger Kolonien die Amplifikation des Gens mittels HotStar-PCR. In Abb. 16 ist repräsentativ das Gelbild der TK mit dem AS-Austausch V238F nach Anzucht in DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup>-T1<sup>®</sup> *E. coli* dargestellt, wobei die Banden bei dem gewünschten Molekulargewicht von ca. 1400 bp liegen. Dieses kommt durch das TK-Gen und die Adaptersequenzen zustande. Für die Herstellung einer VK wurde der Klon, der die stärkste Bande aufwies, verwendet.

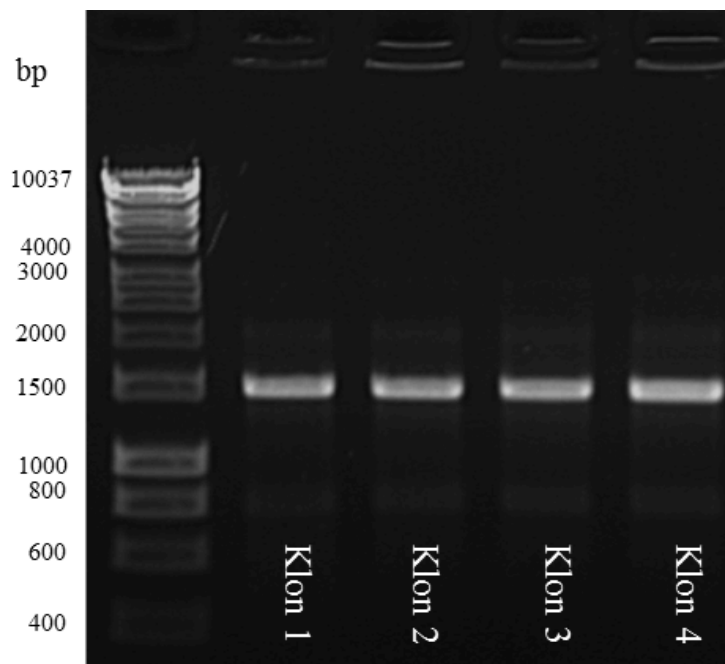
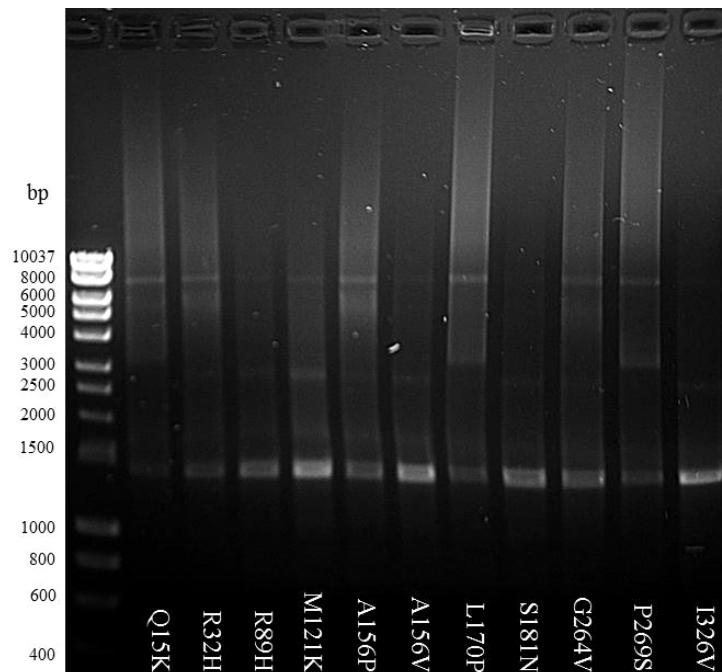


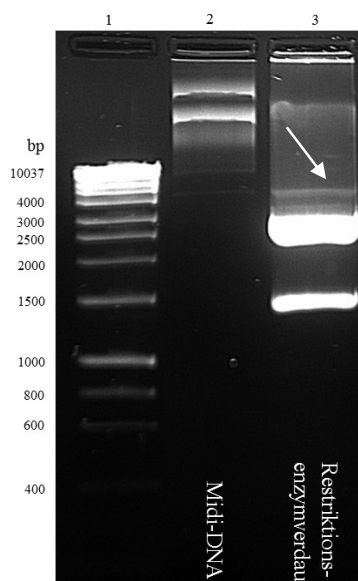
Abb. 16: Gelbild der Kolonie-PCR der Mutation V238F.

Nach Mini- (Kapitel 4.8, S. 3) sowie Midi-Präparation (Kapitel 4.10, S. 45) des Plasmids aus DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup>-T1<sup>®</sup> *E. coli* konnten die TK-Gene aller rekombinanten Plasmide mittels PCR und Agarosegelelektrophorese aufgezeigt werden. Exemplarisch sind die TKs mit den elf Mutationen Q15K, R32H, R89H, M121K, A156P, A156V, L170P, S181N, G264V, P269S und I326V nach Midi-Präparation in Abb. 17 dargestellt. Die Bande der TK liegt bei etwa 1400 bp. Die schwachen Banden, die zum Teil bei etwa 3000 und 8000 bp zu erkennen sind, kommen durch Klonierungsvektoren bzw. Aggregate aus diesen zustande.



**Abb. 17: Elektrophoresebild nach Midi-PCR.**

Um zu zeigen, dass das rekombinante TK-Gen in dem Klonierungsvektor pIX3.0 enthalten ist, wurde exemplarisch die Plasmid-Midi-DNA mit dem AS-Austausch A93V restriktionsenzymatisch geschnitten und durch Gelelektrophorese visualisiert (Abb. 18, S. 62). Dies gelang unter Verwendung der Restriktionsenzyme EcoRI und XhoI (Kapitel 4.10, S. 45). Abbildung 18 (S. 62) zeigt in Linie 2 eine schwache Bande bei etwa 4000 bp, die das unverdaute Plasmid darstellt. Die Banden, die bei einer höheren Molekülmasse liegen, weisen auf aggregierte Plasmide hin. In Linie 3 ist das geschnittene Plasmid zu erkennen, wobei die Bande bei etwa 1400 bp die TK und die Bande bei ca. 2700 bp den Vektor ohne das TK-Gen-Insert anzeigt. Die mit dem weißen Pfeil gekennzeichnete schwache Bande bei 4081 bp weist auf einen Rest noch unverdaute DNA hin.



**Abb. 18: Restriktionsenzymverdau des Plasmids mit der Substitution A93V.**

### 5.3 Sequenzierung des Thymidinkinasegens

Das Vorliegen zusätzlicher AS-Substitutionen im rekombinanten TK-Gen konnte mittels Sequenzierung ausgeschlossen werden. In drei Fällen enthielt das TK-Gen des zuerst verwendeten Klons nach der Mini-Präparation eine unbekannte bzw. zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung unklare AS-Substitution, wie in Tab. 28 dargestellt.

**Tab. 28: Zusätzliche unbekannte oder unklare AS-Substitutionen.**

Gewünschte AS-Substitution	Zusätzliche AS-Substitution
R32H	Q270P
E43D	E39G
S181N	L50P

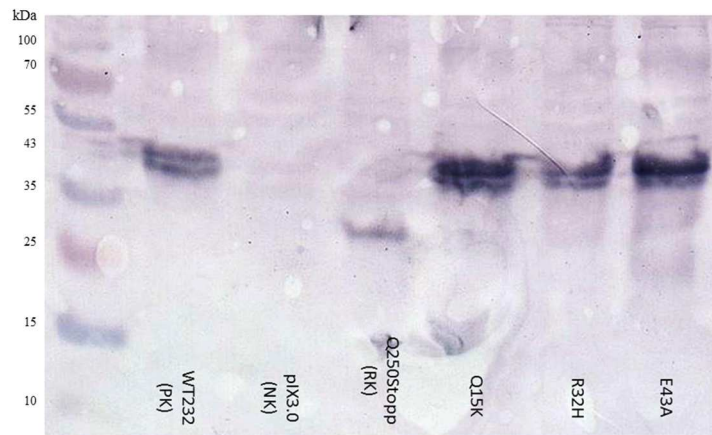
Diese Plasmide wurden verworfen und ein anderer Klon zur Herstellung rekombinanter DNA verwendet. Da sich bei dem rekombinanten Plasmid mit dem Austausch E43D wiederholt die zusätzliche Substitution G39E zeigte, wurde das Produkt der Methyl- und Mutagenese-PCR sequenziert. Es zeigte sich, dass schon hier die unerwünschte Mutation enthalten war. Diese trat bei Wiederholung der PCR abermals auf. Deshalb wurde in diesem Fall ein weiteres Primerpaar definiert, mit welchem G39E durch eine zweite Mutagenese-PCR entfernt werden konnte. Es wurden keine natürlichen Polymorphismen zusätzlich zu denen des WT 232 (GenBank Accession: JQ352247.1) in den rekombinanten TK-Genen detektiert.



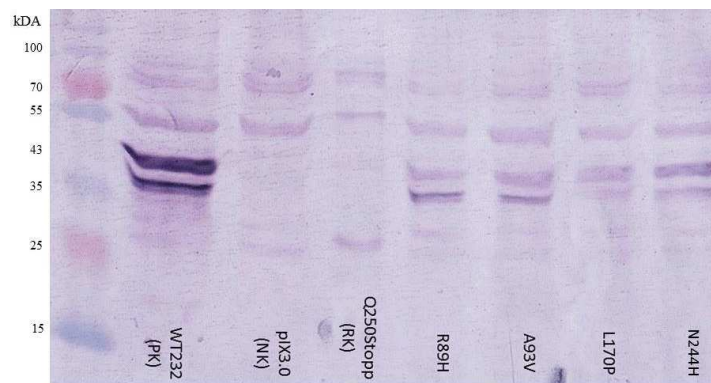
#### 5.4 Visualisierung der *in vitro* und *in vivo* exprimierten Proteine

Der Western Blot diente der Darstellung aller rekombinanten Proteine. Zum einen wurden hier die zellfrei synthetisierten Proteine visualisiert, die mittels zweier Kits hergestellt worden waren: die Proteine mit den AS-Substitutionen Q15K, R32H, E43A, R89H, A93V, M121K, A156P, L170P und S181N mittels Qiagen-Kit und die Proteine mit den Austauschen R20C, E43D, G61E, A156V, R163G, P173Deletion, R216H, V238F, N244H, G264V, P268M, P269S, G271V, S276N, I326V, T183Stopp sowie N376Stopp mittels Bioneer-Kit. Zum anderen konnten Proteine mit den Substitutionen WT 232 (PK), R216H (zRK), R32H, N244H und G264V zusätzlich *in vivo* in BL21(DE3) *E. coli* exprimiert, mittels Strep-tag-Affinitätschromatographie aufgereinigt und im Western Blot dargestellt werden. Es gelang darüber hinaus, die Reinheit dieser Proben durch Coomassie-Färbung zu analysieren.

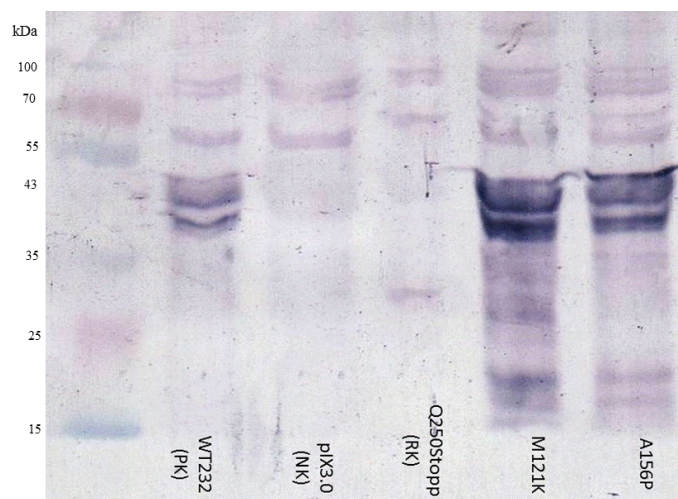
Alle rekombinanten, nicht aufgereinigten Proteine wurden im Vergleich zum WT-Protein (PK), dem TK-Protein mit der Mutation Q250Stopp (RK) und dem Protein aus dem Vektor pIX3.0 ohne TK-Gen-Insert (NK) im Western Blot betrachtet. In den folgenden Abb. sind die Blotbilder der mittels Qiagen-Kit zellfrei synthetisierten und nicht aufgereinigten Proteine dargestellt: Q15K, R32H, E43A (Abb. 19, S. 64), R89H, A93V, L170P, N244H (Abb. 20, S. 64), M121K sowie A156P (Abb. 21, S. 64). Das Molekulargewicht der TK beträgt hierbei 41 kDA (Wagner et al. 1981), zusammen mit den Adaptersequenzen liegt die Bande bei etwa 43 kDA. Da diese Proteine aufgrund des geringen Volumens nicht aufgereinigt werden konnten, zeigen die Blotbilder zusätzlich zu den gewünschten TK-Proteinen unspezifische Banden. Diese sind durch die in den Proteinsynthesekits enthaltenen und für die Transkription sowie Translation essentiellen *E. coli*-Proteine zu erklären. An diese hatte der polyklonale Primär-AK zusätzlich zum TK-Protein gebunden.



**Abb. 19:** Western Blot der mittels Qiagen-Kit synthetisierten rekombinanten Proteine WT 232 (PK), pIX3.0 (NK), Q250Stopp (RK), Q15K, R32H und E43A.



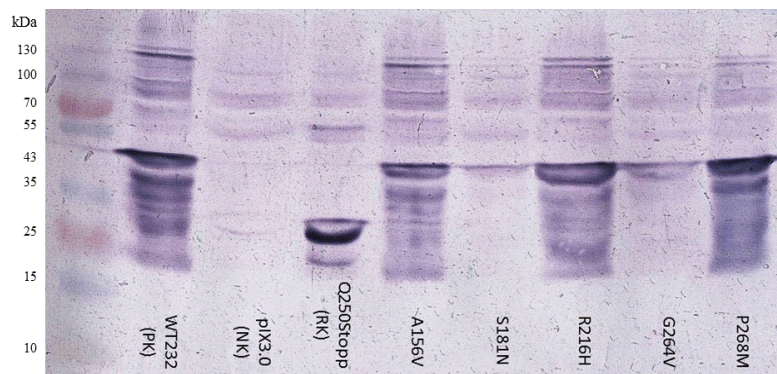
**Abb. 20:** Western Blot der mittels Qiagen-Kit synthetisierten rekombinanten Proteine WT 232 (PK), pIX3.0 (NK), Q250Stopp (RK), R89H, A93V, L170P (zRK) und N244H.



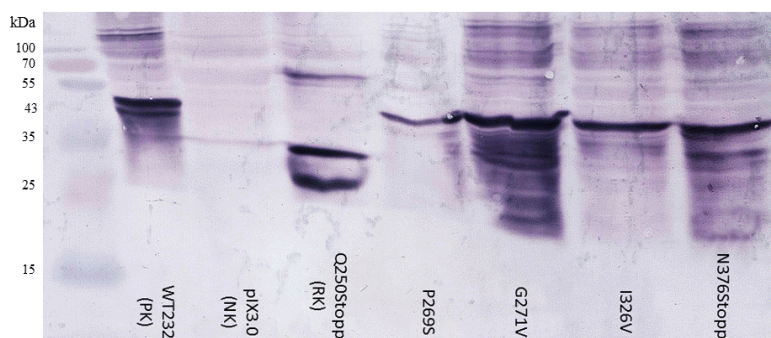
**Abb. 21:** Western Blot der mittels Qiagen-Kit synthetisierten rekombinanten Proteine WT 232 (PK), pIX3.0 (NK), Q250Stopp (RK), M121K und A156P (zPK).

Die Kontrollproben WT 232 (PK), pIX3.0 (NK) und Q250Stopp (RK) konnten in jedem Blot detektiert werden. Allerdings zeigt die PK in einigen Fällen zusätzlich zu der Bande bei 43 kDa eine weitere Bande bei 38 bis 39 kDa, welche eine Isoform des TK-Proteins darstellt. Während die RK, ein auf 250 AS verkürztes TK-Protein, auf einer Höhe von etwa 25 bis 30 kDa sichtbar wird, zeigt die NK nur die bakteriellen Proteine bei ca. 55 und 80 kDa sowie zum Teil auch bei 25 und 23 kDa (Abb. 20, S. 64) in Form schwacher Banden.

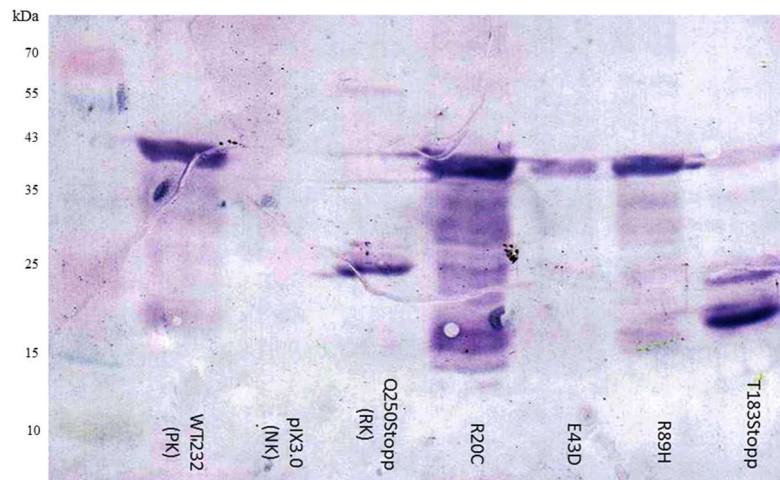
Auf den Nitrocellulosemembranen, bei denen der Blot mit zellfrei synthetisierten und nicht aufgereinigten Proteinen aus dem Kit von Bioneer realisiert wurde, sind zusätzlich Banden von *E. coli*-Proteinen bei 100 bis 130 kDa zu erkennen (Abb. 22 und 23). Folgende TK-Proteine wurden hier dargestellt: A156V, S181N, R216H, G264V, R216H (Abb. 22), P269S, G271V, I326V, N376Stopp (Abb. 23), R20C, E43D, R89H, T183Stopp (Abb. 24, S. 66), G61E, R163G, P173Deletion, V238F und S276N (Abb. 25, S. 66).



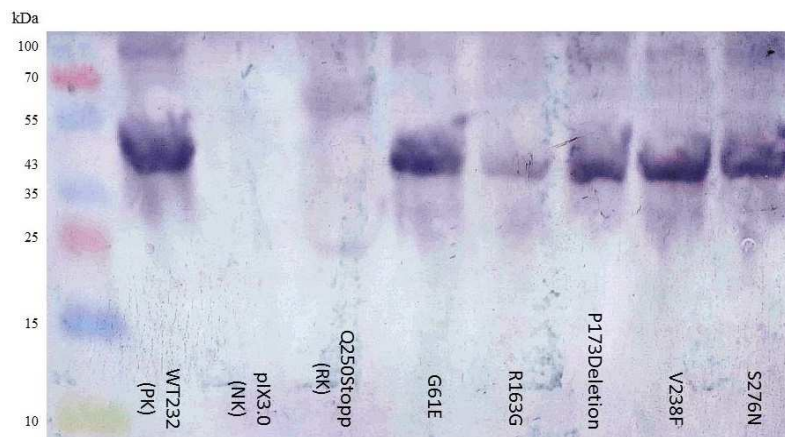
**Abb. 22:** Western Blot der mittels Bioneer-Kit synthetisierten rekombinanten Proteine WT 232 (PK), pIX3.0 (NK), Q250Stopp (RK), A156V, S181N (zRK), R216H (zRK), G264V und P268M (zPK).



**Abb. 23:** Western Blot der mittels Bioneer-Kit synthetisierten rekombinanten Proteine WT 232 (PK), pIX3.0 (NK), Q250Stopp (RK), P269S, G271V, I326V und N376Stopp.



**Abb. 24:** Western Blot der mittels Bioneer-Kit synthetisierten rekombinanten Proteine WT 232 (PK), pIX3.0 (NK), Q250Stopp (RK), R20C, E43D, R89H und T183Stopp (zRK).



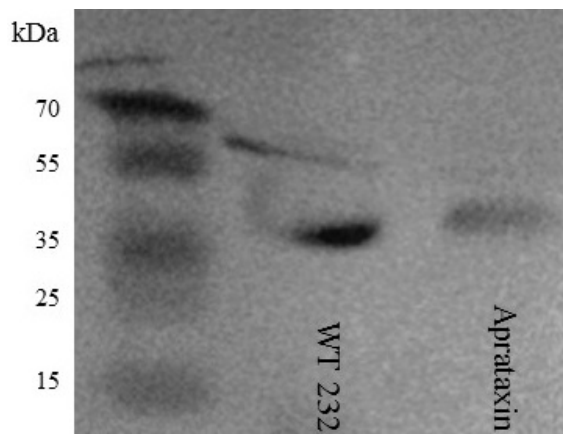
**Abb. 25:** Western Blot der mittels Bioneer-Kit synthetisierten rekombinanten Proteine WT 232 (PK), pIX3.0 (NK), Q250Stopp (RK), G61E, R163G, P173Deletion, V238F und S276N.

Obwohl von jeder Probe 60 µg auf das SDS-Gel aufgetragen worden waren, zeigten sich deutliche Unterschiede in der Stärke der Banden, was auf eine unterschiedliche Menge an TK-Protein zurückzuführen ist. Die Banden der unverkürzten Proteine lagen wie die der PK bei 43 kDa, während das Enzym mit der Mutation T183Stopp bei etwa 20 kDa zu erkennen war (Abb. 24). Da die Substitutionen N376Stopp (Abb. 23, S. 65) sowie P173Deletion (Abb. 25) das rekombinante TK-Protein um nur eine AS verkürzten, zeigte sich im Western Blot kein deutlicher Unterschied zu den TK-Proteinen mit voller Länge. Zudem wiesen die folgenden rekombinanten Proteine ebenso wie das WT-Protein eine zusätzliche Bande bei etwa 39 kDa auf, die als eine Isoform des Enzyms interpretiert wer-



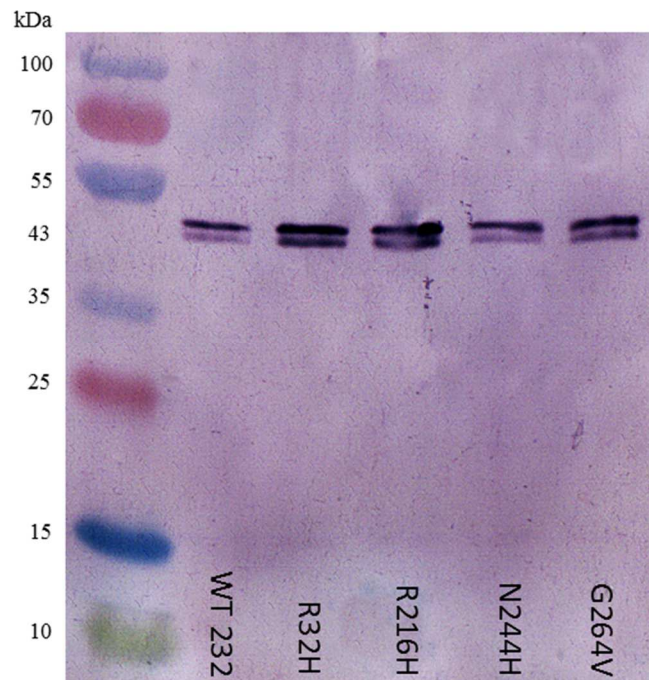
den kann: Q15K, R32H, E43A (Abb. 19, S. 64), R89H, A93V, L170P, N244H (Abb. 20, S. 64), M121K, A156P (Abb. 21, S. 64), A156V sowie R216H (Abb. 23, S. 65).

In Abb. 26 ist ein Western Blot des zellfrei mittels Bioneer-Kit hergestellten, nicht aufgereinigten WT 232-Proteins zu erkennen, der mittels AK gegen den His<sub>6</sub>-tag durchgeführt wurde. Als PK diente in diesem Fall ein humanes His<sub>6</sub>-tagged Aprataxin-Protein mit einem Molekulargewicht von 44 kDa (zur Verfügung gestellt vom Leibniz Institut für Altersforschung/Fritz-Lipman-Institut e.V.). Auf diese Weise konnte der His<sub>6</sub>-tag des nicht aufgereinigten WT 232-Proteins nachgewiesen werden, wobei sich ausschließlich die Bande bei 43 kDa und keine Isoform der TK bei 39 kDa zeigte. Die schwache Bande bei etwa 55 kDa ist durch ein bakterielles Protein zu erklären, an das der Primär-AK unspezifisch gebunden hatte.



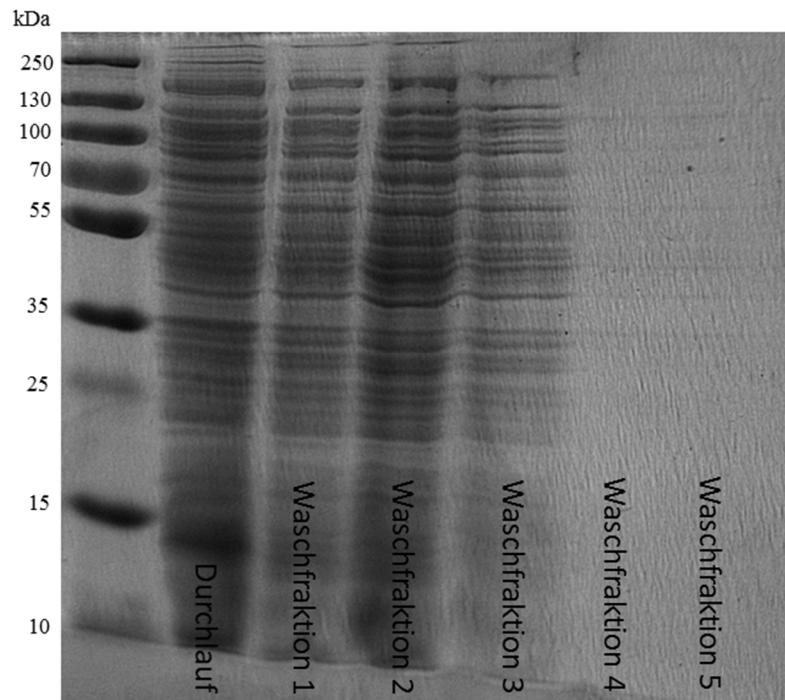
**Abb. 26: Western Blot mittels anti-His<sub>6</sub>-AK des nicht aufgereinigten WT 232 sowie eines humanen Aprataxin-Proteins als PK.**

Darüber hinaus waren die rekombinanten Proteine mit den AS-Substitutionen R32H, N244H und G264V exemplarisch *in vivo* in BL(21)DE3 *E. coli* exprimiert und mittels Strep-tag-Affinitätschromatographie aufgereinigt worden. Als PK diente wie gewohnt der WT 232. Da bei der RK Q250Stopp der Strep-tag durch die Verkürzung nicht mehr vorhanden war, konnte dieses Protein nicht wie zuvor als RK verwendet werden. Stattdessen wurde die TK mit der AS-Substitution R216H (zRK) *in vivo* synthetisiert und aufgereinigt. Abbildung 27 (S. 68) zeigt den Western Blot aller aufgereinigten Proteine. Auch hier stellte sich eine Doppelbande bei 43 bzw. 39 kDa dar, jedoch konnte die TK ohne zusätzliche unspezifische Banden aus bakteriellen Proteinen detektiert werden.



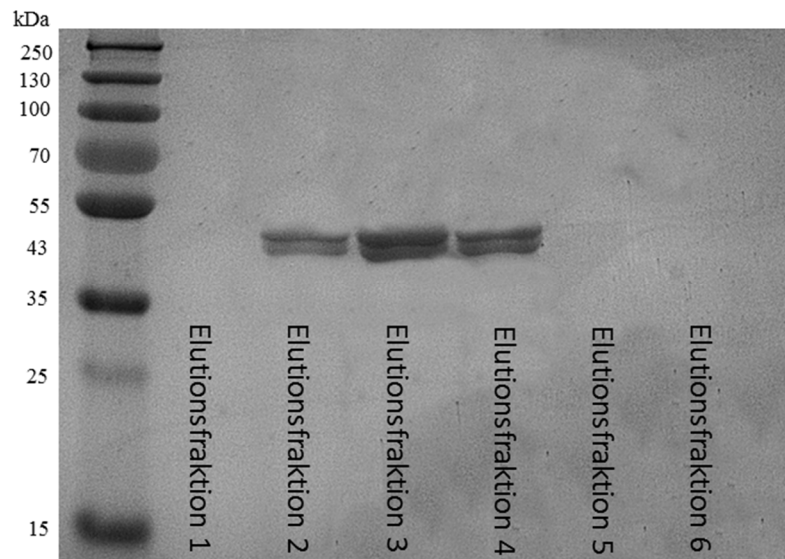
**Abb. 27: Western Blot der aufgereinigten Proteine WT 232 (PK), R32H, R216H (zRK), N244H und G264V.**

Die Reinheit der *in vivo* hergestellten und mittels Strep-tag-Affinitätschromatographie aufgereinigten TK-Proteine konnte darüber hinaus mittels Coomassie-Färbung bestätigt werden, wie exemplarisch für das Protein des WT 232 aus den Abb. 28 und 29 (S. 69) hervorgeht. Diese Abbildungen zeigen Proben jeder Wasch- bzw. Elutionsfraktion der Aufreinigung des WT 232, die mittels Coomassie-Brillant-Blau visualisiert wurden. Da sich dieser Farbstoff unspezifisch an Proteine anlagert, wurden so nicht nur das TK-Protein, sondern auch bakterielle Proteine detektiert. Es ist zu erkennen, dass im ersten, zweiten und dritten Waschschrift (Abb. 28, S. 69) alle detektierbaren bakteriellen Proteine entfernt wurden. Die zweite, dritte und vierte Elutionsfraktion (Abb. 29, S. 69) enthält jeweils Proteine mit einer Molekülmasse von 43 kDa, welche durch Western Blot mittels anti-TK-AK als die gewünschte TK bestätigt worden waren (Abb. 27). In den Elutionsfraktionen mit der TK zeigten sich keine unerwünschten bakteriellen Proteine.



**Abb. 28: Coomassie-Färbung der Aufreinigungsfractionen des *in vivo* exprimierten WT 232-Proteins (Teil 1).**

Es sind der Durchlauf durch die Aufreinigungssäule sowie die Waschfraktionen 1 bis 5 dargestellt.



**Abb. 29: Coomassie-Färbung der Aufreinigungsfractionen des *in vivo* exprimierten WT 232-Proteins (Teil 2).**

Zu erkennen sind Proben aus allen sechs Elutionsfraktionen. Die Bande in den Elutionsfraktionen 2, 3 und 4 auf Höhe von 43 kDa stellt die TK dar.

Abbildung 30 (S. 70) zeigt zusätzlich eine Coomassie-Färbung der dritten Elutionsfraktionen aller aufgereinigten TK-Proteine (WT 232, R32H, R216H, N244H sowie G264V), mit

denen im folgenden Experimente mittels DiviTum<sup>TM</sup>-Test, HPLC/UV und LC/MS/MS durchgeführt wurden. Hier zeigt sich, dass nach der Aufreinigung in keiner Probe unerwünschte bakterielle Proteine enthalten waren.

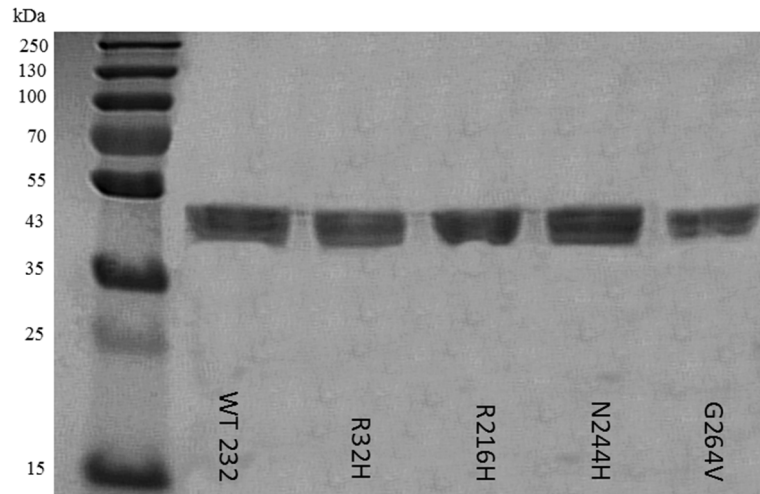


Abb. 30: Dritte Elutionsfraktionen der aufgereinigten Proteine.

### 5.5 DiviTum<sup>TM</sup>-Test

Um die Aktivität der rekombinanten, zellfrei synthetisierten und nicht aufgereinigten TK-Proteine Q15K, R20C, R32H, E43A, E43D, G61E, R89H, A93V, M121K, A156P, A156V, R163G, L170P, P173Deletion, S181N, T183Stopp, R216H, V238F, N244H, G264V, P268M, S276N, P269S, I326V sowie N376Stopp zu ermitteln, wurde ein modifiziertes DiviTum<sup>TM</sup>-Testsystem verwendet (Kapitel 4.17, S. 52). Wie aus vorherigen Untersuchungen von Sauerbrei et al. (2012) bekannt, konnte die Enzymaktivität der Proteine aus dem Qiagen-Kit bei einer Proteinmenge von 2,81 ng nach 180 min Inkubationszeit zur Auswertung herangezogen werden. So wurden aussagekräftige Werte für die TK-Aktivität erhalten, die im Messbereich des Photospektrometers lagen. Die PK WT 232, die mittels Bioneer-Kit hergestellt worden war, wies im Vergleich zu der aus dem Qiagen-Kit jedoch eine rund 33-fach höhere Enzymaktivität auf, sodass bei der Auswertung der Messbereich des Photospektrometers überschritten wurde. Es zeigte sich, dass in diesem Fall die Verdünnungsstufe, in der 0,18 ng Protein eingesetzt worden waren, nach 180 min am besten zur Auswertung geeignet war. Zudem stammten die verwendeten DiviTum<sup>TM</sup>-Testkits aus zwei Chargen. Bei Anwendung der zweiten, verbesserten Charge konnten höhere Konzentrationen an BrdU-MP nachgewiesen werden. Deshalb wird bei der Darstellung der Ergeb-



nisse zwischen Proteinen aus dem Qiagen- und dem Bioneer-Kit sowie zwischen DiviTum<sup>TM</sup>-Kits aus der ersten bzw. der zweiten Charge differenziert.

Die Tab. 29 bis 31 (S. 71 - 73) stellen die Phosphorylierungsaktivitäten der Kontrollproben nach einer finalen Inkubationszeit von 180 min dar und zeigen darüber hinaus die jeweils zugehörige Standardabweichung. Die Verdünnungsstufen bzw. Probenmengen, die zur Einteilung der Aktivität in die Kriterien „positiv“, „schwach positiv“ und „negativ“ dienten, sind hierbei grau hinterlegt. Tabelle 29 bezieht sich auf Kontrollproben, die mittels Qiagen-Kit synthetisiert und mittels DiviTum<sup>TM</sup>-Tests aus der ersten Charge getestet wurden. Für die Kontrollen aus dem Qiagen-Kit, die unter Verwendung von DiviTum<sup>TM</sup>-Kits aus der zweiten Charge getestet wurden, sind die Ergebnisse aus Tab. 30 (S. 72) ersichtlich. Tabelle 31 (S. 72) stellt die Ergebnisse für die Kontrollen aus dem Bioneer-Kit dar. Diese wurden mittels DiviTum<sup>TM</sup>-Kits aus der zweiten Charge getestet.

**Tab. 29: Aktivitäten der mittels Qiagen-Kit synthetisierten, nicht aufgereinigten Kontrollproben in DU/l bei Verwendung von DiviTum<sup>TM</sup>-Kits der ersten Charge, bestimmt nach der finalen Inkubationszeit von 180 min.**

MW: Mittelwert.

S: Standardabweichung.

Mutante	Durchlauf	TK-Phosphorylierungsaktivität [DU/l] bei einer Proteinmenge [ng] von				
		180,00	45,00	11,25	2,81	0,78
WT 232	1	10,5	137,8	532,4	1489,8	1828,5
	2	29,9	107,2	338,2	1048,0	2198,4
	3	47,5	111,5	372,2	1104,2	2067,8
	MW	29,3	118,8	414,3	<b>1214,0</b>	2031,6
	S	18,5	16,6	103,7	240,5	187,6
Q250Stopp	1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	1,7	0,0	0,0	0,0	0,0
	3	4,4	0,0	0,0	0,0	0,0
	MW	2,0	0,0	0,0	<b>0,0</b>	0,0
	S	2,2	0,0	0,0	0,0	0,0
pIX3.0	1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0
	3	1,2	0,0	0,0	0,0	0,0
	MW	0,6	0,0	0,0	<b>0,0</b>	0,0
	S	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0
A156P (zPK)	1	25,9	54,6	491,8	1265,3	4152,3
	2	29,4	104,7	394,9	1611,4	4211,8
	3	43,9	90,7	414,7	1672,3	4903,7
	MW	33,1	83,3	433,8	<b>1516,3</b>	4422,6
	S	9,5	25,8	51,2	219,5	417,7

**Tab. 30: Aktivitäten der mittels Qiagen-Kit synthetisierten, nicht aufgereinigten Kontrollproben in DU/l bei Verwendung von DiviTum™-Kits der zweiten Charge, bestimmt nach der finalen Inkubationszeit von 180 min.**

MW: Mittelwert.

S: Standardabweichung.

Mutante	Durchlauf	TK-Phosphorylierungsaktivität [DU/l] bei einer Proteinmenge [ng] von				
		180,00	45,00	11,25	2,81	0,78
<b>WT 232</b>	1	95,6	454,8	1999,2	<b>5316,5</b>	18192,0
<b>Q250Stopp</b>	1	0,5	0,0	0,0	<b>0,0</b>	0,0
<b>pIX3.0</b>	1	3,9	0,0	0,0	<b>0,0</b>	0,0
<b>L170P (zRK)</b>	1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	<b>MW</b>	0,0	0,0	0,0	<b>0,0</b>	0,0
	<b>S</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

**Tab. 31: Aktivitäten der mittels Bioneer-Kit synthetisierten, nicht aufgereinigten Kontrollproben in DU/l bei Verwendung von DiviTum™-Kits der zweiten Charge, bestimmt nach der finalen Inkubationszeit von 180 min.**

MW: Mittelwert.

n.d.: nicht durchführbar.

OF: overflow, Messbereichsüberschreitung nach oben.

S: Standardabweichung.

Mutante	Durchlauf	TK-Phosphorylierungsaktivität [DU/l] bei einer Proteinmenge [ng] von				
		2,81	0,78	0,18	0,04	0,01
<b>WT 232</b>	1	OF	19924,5	8949,8	1300,5	0,0
	2	OF	OF	35036,2	5263,4	901,1
	3	OF	34746,9	32768,0	12738,6	0,0
	4	OF	29065,6	27563,5	5908,5	0,0
	5	OF	34410,9	57108,5	26234,9	123453,4
	6	OF	30993,9	62906,9	38379,5	5980,2
	7	OF	32505,6	27566,1	3870,7	0,0
	8	OF	OF	38538,2	8284,2	0,0
	9	OF	OF	67625,0	23265,3	0,0
	<b>MW</b>	n.d.	n.d.	<b>39784,7</b>	13916,2	14481,6
	<b>S</b>	n.d.	n.d.	19146,2	12598,5	40911,3
<b>Q250Stopp</b>	1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	3	62,4	0,0	0,0	0,0	0,0
	4	59,4	26,9	0,0	0,0	0,0
	5	13,8	0,0	0,0	0,0	0,0
	6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	7	30,2	0,0	0,0	0,0	0,0
	8	52,2	0,0	0,0	0,0	0,0
	9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	<b>MW</b>	24,2	3,0	<b>0,0</b>	0,0	0,0
	<b>S</b>	27,3	9,0	0,0	0,0	0,0

Fortsetzung Tab. 31.

Mutante	Durch- lauf	TK-Phosphorylierungsaktivität [DU/l] bei einer Proteinmenge [ng] von				
		2,81	0,78	0,18	0,04	0,01
<b>pIX3.0</b>	1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	3	60,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	4	40,5	0,0	0,0	0,0	0,0
	5	9,8	0,0	0,0	0,0	0,0
	6	123,5	0,0	0,0	0,0	0,0
	7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	<b>MW</b>	26,0	0,0	<b>0,0</b>	0,0	0,0
	<b>S</b>	42,6	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>S181N (zRK)</b>	1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	<b>MW</b>	0,0	0,0	<b>0,0</b>	0,0	0,0
	<b>S</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>T183Stopp (zRK)</b>	1	29,3	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	<b>MW</b>	9,8	0,0	<b>0,0</b>	0,0	0,0
	<b>S</b>	16,9	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>R216H (zRK)</b>	1	295,7	187,5	0,0	0,0	0,0
	2	297,9	167,0	0,0	0,0	0,0
	3	304,2	262,4	0,0	0,0	0,0
	<b>MW</b>	299,3	205,7	<b>0,0</b>	0,0	0,0
	<b>S</b>	4,4	50,2	0,0	0,0	0,0
<b>P268M (zPK)</b>	1	OF	OF	75957,8	30208,0	0,0
	2	OF	OF	87992,3	35235,8	8028,2
	3	OF	OF	64463,4	17090,6	2293,8
	<b>MW</b>	n.d.	n.d.	<b>76137,8</b>	27511,5	3440,6
	<b>S</b>	n.d.	n.d.	11765,5	9368,4	4135,1

Aus den Ergebnissen der NK wurden, wie in Kapitel 4.17 (S. 52) beschrieben, Cut-offs definiert sowie 10% der Aktivität des WT 232 berechnet, sodass sich die Phosphorylierungsaktivität der rekombinanten Proteine in die Kategorien „positiv“, „schwach positiv“ und „negativ“ einteilen ließ. Auch hier musste zwischen den Proteinen, die mit dem Qiagen- bzw. dem Bioneer-Kit synthetisiert worden waren, und den zwei Chargen des Divi-Tum<sup>TM</sup>-Testsystems differenziert werden. Die Bewertungskriterien finden sich in den Tab. 32 bis 34 (S. 74).

**Tab. 32: Bewertung der TK-Aktivität der rekombinanten, nicht aufgereinigten Proteine aus dem Qiagen-Kit bei Anwendung von DiviTum<sup>TM</sup>-Kits der ersten Charge.**

Bewertung der TK-Aktivität	Kriterium
negativ	$\leq 0,0 \text{ DU/l}$
schwach positiv	$> 0,0 \text{ DU/l}$ und $\leq 121,4 \text{ DU/l}$
positiv	$> 121,4 \text{ DU/l}$

**Tab. 33: Bewertung der TK-Aktivität der rekombinanten, nicht aufgereinigten Proteine aus dem Qiagen-Kit bei Anwendung von DiviTum<sup>TM</sup>-Kits der zweiten Charge.**

Bewertung der TK-Aktivität	Kriterium
negativ	$\leq 0,0 \text{ DU/l}$
schwach positiv	$> 0,0 \text{ DU/l}$ und $\leq 531,7 \text{ DU/l}$
positiv	$> 531,7 \text{ DU/l}$

**Tab. 34: Bewertung der TK-Aktivität der rekombinanten, nicht aufgereinigten Proteine aus dem Bioneer-Kit bei Anwendung von DiviTum<sup>TM</sup>-Kits der zweiten Charge.**

Bewertung der TK-Aktivität	Kriterium
negativ	$\leq 0,0 \text{ DU/l}$
schwach positiv	$> 0,0 \text{ DU/l}$ und $\leq 3978,5 \text{ DU/l}$
positiv	$> 3978,5 \text{ DU/l}$

In den Tab. 35 bis 37 (S. 75 - 77) ist nun die Phosphorylierungsaktivität der zellfrei synthetisierten, nicht aufgereinigten TK-Proteine mit den zu charakterisierenden unklaren oder bislang unbekannten AS-Substitutionen nach der finalen Inkubationszeit von 180 min aufgezeigt. Zusätzlich wird die Einteilung in die Kategorien „positiv“, „schwach positiv“ und „negativ“ vorgenommen, wobei auch hier die entscheidende Verdünnungsstufe grau hinterlegt ist. Tabelle 35 (S. 75) bezieht sich auf Proteine aus dem Qiagen-Kit, die mittels DiviTum<sup>TM</sup>-Kits der ersten Charge getestet wurden. Die Enzymaktivitäten der Proteine aus dem Qiagen-Kit, die unter Verwendung von DiviTum<sup>TM</sup>-Kits der zweiten Charge untersucht wurden, sind in Tab. 36 (S. 75) aufgeführt. Tabelle 37 (S. 76) stellt die Ergebnisse für rekombinante Proteine aus dem Bioneer-Kit da, wobei diese alle mittels DiviTum<sup>TM</sup>-Kits der zweiten Charge analysiert wurden.

**Tab. 35:** Aktivitäten der rekombinanten, nicht aufgereinigten Proteine aus dem Qiagen-Kit in DU/I bei Verwendung von DiviTum™-Kits der ersten Charge, bestimmt nach der finalen Inkubationszeit von 180 min.

M: Mittelwert.

n.a.: nicht auswertbar.

S: Standardabweichung.

Mutante	Durchlauf	TK-Phosphorylierungsaktivität [DU/I] bei einer Proteinmenge [ng] von					Bewertung der TK-Aktivität
		180,00	45,00	11,25	2,81	0,78	
Q15K	1	18,2	115,1	491,4	1590,1	1846,5	positiv
	2	37,5	121,8	545,2	2038,7	5328,6	
	3	39,3	134,6	614,7	2011,2	4975,4	
	MW	31,6	123,8	550,5	<b>1880,0</b>	4050,2	
	S	11,7	9,9	61,8	251,5	1916,6	
R32H	1	43,3	107,4	608,3	2662,6	5776,6	positiv
	2	38,1	96,9	452,1	1586,4	3306,9	
	3	48,0	120,0	590,6	2446,2	7902,7	
	MW	43,1	108,1	550,3	<b>2231,7</b>	5662,1	
	S	5,0	11,6	85,6	569,2	2300,1	
E43A	1	10,1	91,6	466,1	1778,9	4487,0	positiv
	2	41,3	102,8	461,8	1874,6	5552,0	
	3	16,5	53,8	265,0	941,9	2254,7	
	MW	22,6	82,7	397,6	<b>1531,8</b>	4097,9	
	S	16,5	25,7	114,9	513,1	1682,7	
A93V	1	11,7	12,1	26,8	n.a.	0,0	negativ
	2	29,2	19,0	31,2	0,0	0,0	
	3	19,6	22,6	n.a.	0,0	0,0	
	MW	20,1	17,9	29,0	<b>0,0</b>	0,0	
	S	8,7	5,3	3,1	0,0	0,0	
M121K	1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	negativ
	2	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	MW	0,7	0,0	0,0	<b>0,0</b>	0,0	
	S	1,2	0,0	0,0	0,0	0,0	

**Tab. 36:** Aktivität der rekombinanten, nicht aufgereinigten Proteine aus dem Qiagen-Kit in DU/I bei Verwendung von DiviTum™-Kits der zweiten Charge, bestimmt nach der finalen Inkubationszeit von 180 min.

MW: Mittelwert.

S: Standardabweichung.

Mutante	Durchlauf	TK-Phosphorylierungsaktivität [DU/I] bei einer Proteinmenge [ng] von					Bewertung der TK-Aktivität
		180,00	45,00	11,25	2,81	0,78	
R89H	1	118,3	580,2	2905,3	7263,2	12817,3	positiv
	2	92,3	463,2	2323,6	5833,1	13539,2	
	3	120,9	590,6	2938,6	7640,6	12056,3	
	MW	110,5	544,7	2722,5	<b>6912,3</b>	12804,3	
	S	15,8	70,8	345,9	953,5	741,5	

Fortsetzung Tab. 36.

Mutante	Durch- lauf	TK-Phosphorylierungsaktivität [DU/l] bei einer Proteinmenge [ng] von					Bewertung der TK-Aktivität
		180,00	45,00	11,25	2,81	0,78	
N244H	1	54,1	147,3	183,5	397,8	0,0	schwach positiv
	2	57,6	160,8	330,4	686,1	0,0	
	3	52,7	92,5	199,1	490,6	0,0	
	MW	54,8	133,5	237,7	<b>524,8</b>	0,0	
	S	2,5	36,1	80,7	147,2	0,0	

**Tab. 37: Aktivitäten der rekombinanten, nicht aufgereinigten Proteine aus dem Bioneer-Kit in DU/l bei Verwendung von DiviTum™-Kits der zweiten Charge, bestimmt nach der finalen Inkubationszeit von 180 min.**

MW: Mittelwert.

n.a.: nicht auswertbar.

n.d.: nicht durchführbar.

OF: overflow, Messbereichsüberschreitung nach oben.

S: Standardabweichung.

Mutante	Durch- lauf	TK-Phosphorylierungsaktivität [DU/l] bei einer Proteinmenge [ng] von					Bewertung der TK-Aktivität
		2,81	0,78	0,18	0,04	0,01	
R20C	1	OF	OF	101900,8	72509,4	20111,4	positiv
	2	OF	OF	73062,4	42086,4	n.a.	
	3	OF	OF	91586,6	73420,8	100311,0	
	MW	OF	OF	<b>88849,9</b>	62672,2	60211,2	
	S	n.d.	n.d.	14612,7	17833,7	56709,7	
E43D	1	8209,9	18612,5	44398,1	97628,2	n.a.	positiv
	2	7818,1	26128,6	46110,7	18288,6	57344,0	
	3	8259,2	25910,4	56407,0	49141,8	15196,2	
	MW	8095,7	23550,5	<b>48971,9</b>	55019,5	36270,1	
	S	241,7	4277,8	6495,7	39995,0	29803,0	
G61E	1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	negativ
	2	34,4	0,0	0,0	0,0	0,0	
	3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	MW	11,5	0,0	<b>0,0</b>	0,0	0,0	
	S	19,9	0,0	0,0	0,0	0,0	
A156V	1	7556,8	15114,2	13066,2	0,0	0,0	positiv
	2	7090,2	11518,1	8179,2	0,0	0,0	
	3	7735,7	16782,7	8417,3	1423,4	n.a.	
	MW	7460,9	14471,7	<b>9887,6</b>	474,5	0,0	
	S	333,2	2690,5	2755,4	821,8	0,0	
R163G	1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	negativ
	2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	3	50,9	105,6	0,0	0,0	0,0	
	MW	17,0	35,2	<b>0,0</b>	0,0	0,0	
	S	29,4	61,0	0,0	0,0	0,0	

Fortsetzung Tab. 37.

Mutante	Durch- lauf	TK-Phosphorylierungsaktivität [DU/l] bei einer Proteinmenge [ng] von					Bewertung der TK-Aktivität
		2,81	0,78	0,18	0,04	0,01	
<b>P173Deletion</b>	1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	negativ
	2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	3	25,4	0,0	0,0	0,0	0,0	
	<b>MW</b>	8,5	0,0	<b>0,0</b>	0,0	0,0	
	<b>S</b>	14,7	0,0	0,0	0,0	0,0	
<b>V238F</b>	1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	negativ
	2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	3	93,3	0,0	0,0	0,0	0,0	
	<b>MW</b>	31,3	0,0	<b>0,0</b>	0,0	0,0	
	<b>S</b>	53,9	0,0	0,0	0,0	0,0	
<b>G264V</b>	1	348,5	0,0	0,0	0,0	0,0	negativ
	2	268,6	0,0	0,0	0,0	0,0	
	3	416,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	<b>MW</b>	344,4	0,0	<b>0,0</b>	0,0	0,0	
	<b>S</b>	73,8	0,0	0,0	0,0	0,0	
<b>P269S</b>	1	OF	OF	61478,4	26347,5	20316,2	positiv
	2	OF	OF	51302,4	12943,4	1024,0	
	3	OF	OF	58055,7	30197,8	n.a.	
	<b>MW</b>	n.d.	n.d.	<b>56945,5</b>	23162,9	10670,1	
	<b>S</b>	n.d.	n.d.	5178,0	9057,3	13641,6	
<b>G271V</b>	1	OF	OF	39319,0	15626,2	0,0	positiv
	2	OF	OF	38999,0	9287,7	0,0	
	3	OF	140753,9	25848,3	1561,6	0,0	
	<b>MW</b>	n.d.	n.d.	<b>34722,1</b>	8825,2	0,0	
	<b>S</b>	n.d.	n.d.	7686,6	7043,7	0,0	
<b>S276N</b>	1	OF	18781,4	10327,0	0,0	0,0	positiv
	2	7887,7	16483,2	9484,8	n.a.	0,0	
	3	8268,3	17689,6	12183,0	0,0	0,0	
	<b>MW</b>	n. d.	17651,4	<b>10665,0</b>	0,0	0,0	
	<b>S</b>	n. d.	1149,6	1380,5	0,0	0,0	
<b>I326V</b>	1	7762,2	17041,9	12185,6	1669,1	3645,4	positiv
	2	8773,1	26035,2	39081,0	14264,3	n.a.	
	3	7486,4	14510,1	9812,5	n.a.	3153,9	
	<b>MW</b>	8007,3	19195,7	<b>20359,7</b>	5311,1	2266,5	
	<b>S</b>	677,4	6056,9	16256,5	7798,5	1978,1	
<b>N376Stopp</b>	1	1169,4	1529,0	368,6	0,0	0,0	schwach positiv
	2	2238,9	2768,6	232,96	0,0	0,0	
	3	904,2	953,0	366,1	0,0	0,0	
	<b>MW</b>	1437,5	1750,2	<b>322,6</b>	0,0	0,0	
	<b>S</b>	706,6	927,8	77,6	0,0	0,0	

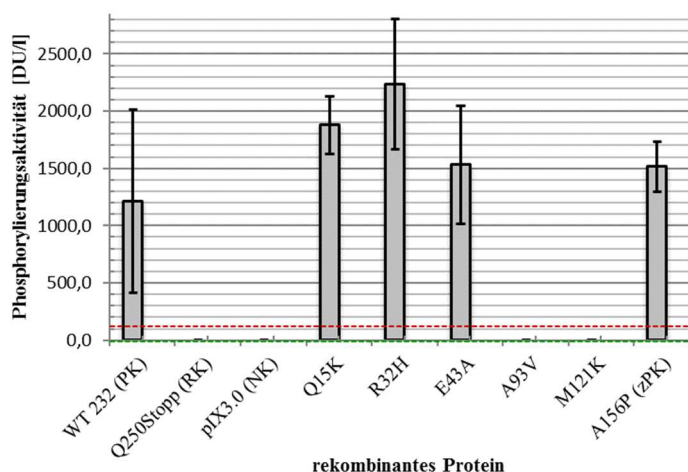
Insgesamt konnte die TK-Aktivität der elf Proteine Q15K, R20C, R32H, E43A, E43D, R89H, A156V, P269S, G271V, S276N und I326V als positiv charakterisiert werden, so dass die im TK-Gen enthaltenen AS-Substitutionen als natürliche Genpolymorphismen

gelten. Die negative Phosphorylierungsaktivität der sieben Proteine G61E, A93V, R163G, P173Deletion, M121K, V238F und G264V führte zur Klassifizierung der entsprechenden AS-Veränderungen als Resistenz-assoziiert. Die beiden Proteine N244H und N376Stopp zeigten im DiviTum<sup>TM</sup>-Test eine schwach positive Enzymaktivität. Die Phosphorylierungsaktivität der zPK A156P und P268M wurde als positiv, die der zRK L170P, S181N, T183Stopp und R216H als negativ bestätigt. Eine zusammenfassende Darstellung dieser Ergebnisse ist in Tab. 38 zu finden.

**Tab. 38: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse des DiviTum<sup>TM</sup>-Tests mit zellfrei synthetisierten, nicht aufgereinigten Proteinen.**

Klassifizierung	TK-Aktivität	AS-Substitutionen
natürlicher Polymorphismus	positiv	Q15K, R20C, R32H, E43A, E43D, R89H, A156P (zPK), A156V, P268M (zPK), P269S, G271V, S276N, I326V
Polymorphismus mit schwach positiver Aktivität	schwach positiv	N244H, N376Stopp
Resistenzmutation	negativ	G61E, A93V, M121K, R163G, L170P (zRK), P173Deletion, T183Stopp (zRK), R216H (zRK) V238F, G264V

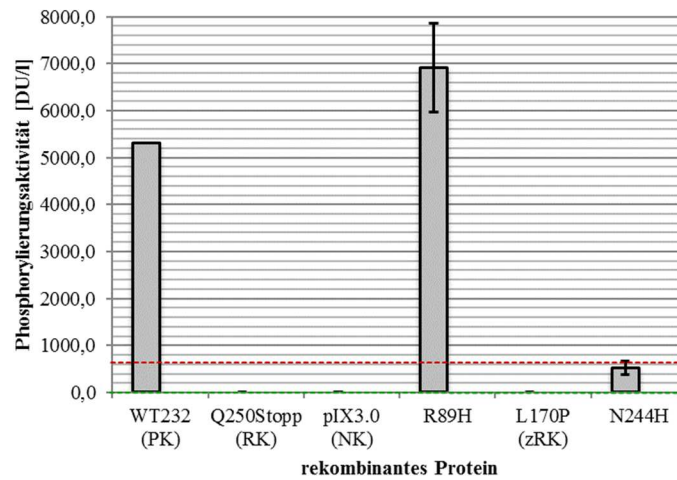
Die Abb. 31 bis 33 (S. 78 - 79) verdeutlichen graphisch die Unterschiede zwischen den Phosphorylierungsaktivitäten der rekombinanten TK-Proteine. Die rote Gerade zeigt den Grenzwert positiver, die grüne Linie den Grenzwert negativer Aktivität an. Phosphorylierungsaktivitäten, die zwischen beiden Linien liegen, wurden als schwach positiv gewertet.



**Abb. 31: Phosphorylierungsaktivität der Proteine aus dem Qiagen-Kit, die mittels DiviTum<sup>TM</sup>-Kits der ersten Charge getestet wurden.**

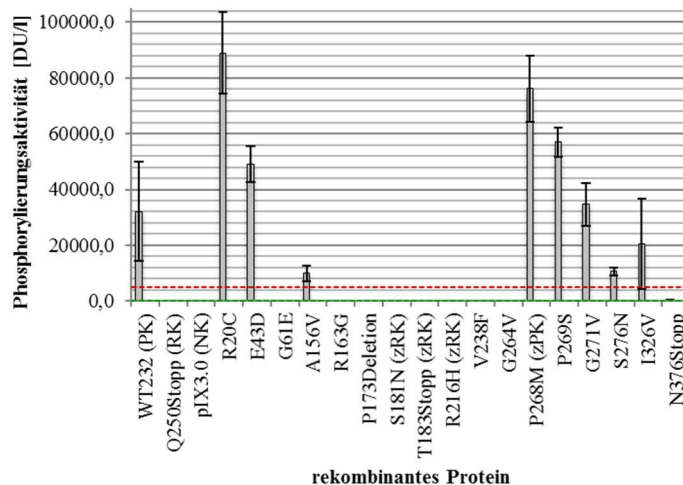
Die rote Gerade zeigt den Grenzwert positiver, die grüne den Grenzwert negativer Phosphorylierungsaktivität an. Aktivitäten zwischen beiden Linien wurden als schwach positiv gewertet.





**Abb. 32: Phosphorylierungsaktivität der Proteine aus dem Qiagen-Kit, die mittels DiviTum™-Kits der zweiten Charge getestet wurden.**

Die rote Gerade zeigt den Grenzwert positiver, die grüne den Grenzwert negativer Phosphorylierungsaktivität an. Aktivitäten zwischen beiden Linien wurden als schwach positiv gewertet.



**Abb. 33: Phosphorylierungsaktivität der Proteine aus dem Bioneer-Kit, die mittels DiviTum™-Kits der zweiten Charge getestet wurden.**

Die rote Gerade zeigt den Grenzwert positiver, die grüne den Grenzwert negativer Phosphorylierungsaktivität an. Aktivitäten zwischen beiden Linien wurden als schwach positiv gewertet.

Darüber hinaus erfolgte die Überprüfung der *in vivo* exprimierten und anschließend mittels Strep-tag-Affinitätschromatographie aufgereinigten TK-Proteine WT 232, R32H, R216H, N244H und G264V im DiviTum™-Test in Dreifachbestimmung. Da hier reine TK-Proteine ohne zusätzliche *E. coli*-Proteine eingesetzt wurden, lag die Aktivität der Enzyme beim Einsatz von 0,18 ng Protein weit oberhalb des messbaren Bereiches. Deshalb musste

zur Erlangung aussagekräftiger Ergebnissen eine wesentlich niedrigere Proteinmenge im Bereich von 0,70 pg bis maximal 11,25 pg eingesetzt werden. Zudem wurde ein nicht aufgereinigtes WT-Protein aus dem Bioneer-Kit in den schon zuvor verwendeten Verdünnungsstufen mitgeführt. Die Ergebnisse der Testungen der Kontrollproben WT 232 und R216H sind aus Tab. 39 ersichtlich. Da durch die Aufreinigung der Proben alle bakteriellen Proteine entfernt worden waren, konnte an dieser Stelle auf die Mitführung der NK pIX 3.0 verzichtet werden.

**Tab. 39: Ergebnisse des DiviTum<sup>TM</sup>-Tests der aufgereinigten Kontrollproben im Vergleich zur nicht aufgereinigten WT-TK.**

MW: Mittelwert.

n.d.: nicht durchführbar.

OF: overflow, Messbereichsüberschreitung nach oben.

S: Standardabweichung.

Protein	Durchlauf	TK-Phosphorylierungsaktivität [DU/l] bei einer Proteinmenge [ng] von					Bewertung der TK-Aktivität
		2,81	0,78	0,18	0,04	0,01	
<b>WT 232 (nicht aufgereinigt)</b>	1	OF	21128,3	14041,6	747,52	491,52	positiv
	2	OF	22559,4	13102,1	1218,6	1064,96	
	3	OF	23946,6	15621,7	1310,7	819,2	
	<b>MW</b>	n.d.	22544,8	<b>14255,1</b>	1092,3	791,9	
	<b>S</b>	n.d.	1409,2	1273,3	302,1	287,7	
Aufgereinigtes Protein	Durchlauf	TK-Phosphorylierungsaktivität [DU/l] bei einer Proteinmenge [pg] von					Bewertung der TK-Aktivität
		10,0	5,0	2,5	1,25	0,63	
<b>WT 232 (PK)</b>	1	1795850,2	1762918,4	1506508,8	1443102,7	285081,6	positiv
	2	2030510,1	1845084,2	1285324,8	1709834,2	452853,8	
	3	2204426,2	1825095,7	1615790,1	1196917,8	279838,7	
	<b>MW</b>	n.d.	1811038,8	<b>1469207,9</b>	1449951,6	339258,0	
	<b>S</b>	n.d.	42850,1	168360,8	256526,8	98411,7	
<b>R216H (RK)</b>	1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	negativ
	2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	<b>MW</b>	0,0	0,0	<b>0,0</b>	0,0	0,0	
	<b>S</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	

Abermals wurden Cut-off-Werte definiert (Tab. 40), um die Aktivität der aufgereinigten Proteine mit unbekannten oder unklaren AS-Substitutionen bestimmen zu können (Tab. 41).

**Tab. 40: Bewertung der TK-Aktivität der aufgereinigten Proteine.**

Bewertung der TK-Aktivität	Kriterium
negativ	$\leq 0,0$ DU/l
schwach positiv	$> 0,0$ DU/l und $\leq 146920,8$ DU/l
positiv	$> 146920,78$ DU/l

**Tab. 41: Aktivitäten der *in vivo* synthetisierten, aufgereinigten Proteine in DU/l bei Verwendung von DiviTum<sup>TM</sup>-Kits der zweiten Charge, bestimmt nach der finalen Inkubationszeit von 180 min.**

MW: Mittelwert.

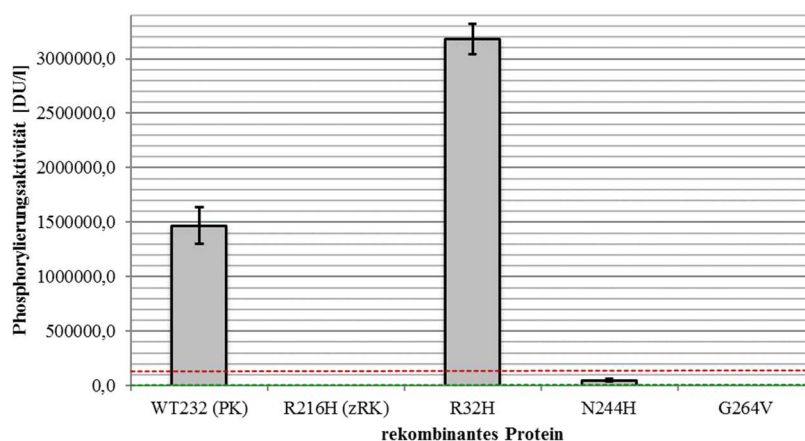
n.d.: nicht durchführbar.

OF: overflow, Messbereichsüberschreitung nach oben.

S: Standardabweichung.

Aufge- reinigtes Protein	Durch- lauf	TK-Phosphorylierungsaktivität [DU/l] bei einer Proteinmenge [pg] von					Bewertung der TK- Aktivität
		10,0	5,0	2,5	1,25	0,63	
<b>R32H</b>	1	OF	3704995,8	3095065,6	944783,4	521011,2	positiv
	2	OF	3893657,6	3110581,8	748979,0	400605,0	
	3	OF	4270981,1	3342251,5	1056192,0	497497,6	
	<b>MW</b>	n.d.	3956544,8	<b>3182633,0</b>	916651,5	473037,9	
	<b>S</b>	n.d.	288185,6	138451,2	155526,6	63821,0	
<b>N244H</b>	1	84500,5	72115,2	38830,8	20320,3	0,0	schwach positiv
	2	62563,2	53411,8	62095,4	46587,1	0,0	
	3	78414,7	61984,2	51387,2	30441,5	0,0	
	<b>MW</b>	75159,5	62503,7	<b>50771,1</b>	32449,6	0,0	
	<b>S</b>	11325,1	9362,5	11644,5	13248,0	0,0	
<b>G264V</b>	1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	negativ
	2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	<b>MW</b>	0,0	0,0	<b>0,0</b>	0,0	0,0	
	<b>S</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	

Die im DiviTum<sup>TM</sup>-Assay erhaltenen Resultate bei Einsatz der *in vivo* exprimierten, aufgereinigten Proteine sind graphisch in Abb. 34 (S. 82) dargestellt. Abermals zeigt die rote Gerade den Grenzwert positiver, die grüne Linie den Grenzwert negativer Aktivität an. Phosphorylierungsaktivitäten zwischen beiden Linien wurden wie schon zuvor als schwach positiv gewertet.



**Abb. 34: Phosphorylierungsaktivität der aufgereinigten Proteine.**

Die rote Gerade zeigt den Grenzwert positiver, die grüne den Grenzwert negativer Phosphorylierungsaktivität an. Aktivitäten zwischen beiden Linien wurden als schwach positiv gewertet.

Die Ergebnisse der Enzymaktivität von nicht aufgereinigten bzw. aufgereinigten TK-Proteinen wurden exemplarisch für den WT 232 verglichen. Hierfür musste dieselbe Verdünnungsstufe für beide Proteine herangezogen werden. Auswertbare Ergebnisse für beide WT-Proteine waren nur bei einer Messung nach 30 min in der Verdünnungsstufe 1:51200 (0,18 ng Protein) möglich. Diese Werte sind aus Tab. 42 ersichtlich. Alle anderen Stufen überschritten bei einem der beiden Proteine entweder den Messbereich oder die kalkulierte Enzymaktivität war negativ. Das nicht aufgereinigte Proteingemisch zeigte rund 1,5% der Aktivität des aufgereinigten Proteins.

**Tab. 42: Vergleich der Phosphorylierungsaktivität von aufgereinigtem und nicht aufgereinigtem WT 232-Protein im DiviTum<sup>TM</sup>-Test nach einer Inkubationszeit von 30 min.**

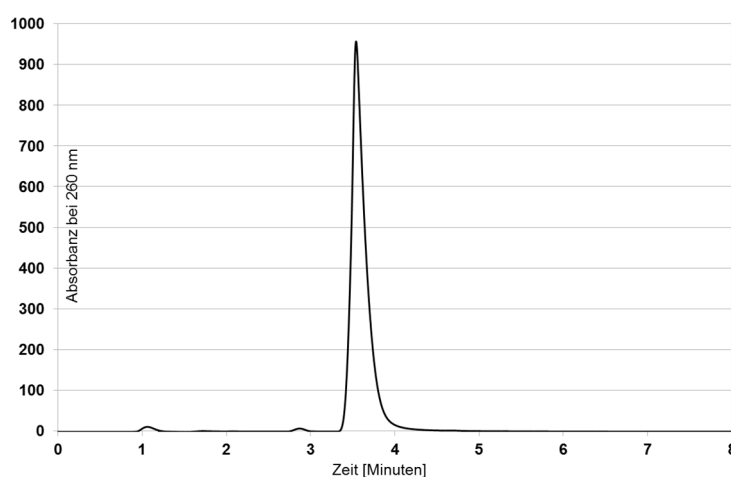
MW: Mittelwert.

S: Standardabweichung.

WT-Protein	Durchlauf	TK-Phosphorylierungsaktivität [DU/l] bei einer Proteinmenge von 0,18 ng	Relative Aktivität [%]
Aufgereinigt	1	140254,7	100
	2	179851,4	
	3	165712,5	
	MW	<b>161939,5</b>	
	S	20066,2	
Nicht aufgereinigt	1	2268,2	1,5
	2	2424,3	
	3	2823,5	
	MW	<b>2505,3</b>	
	S	286,3	

## 5.6 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie/UV-Spektrometrie

Diese Methode wurde mittels exemplarischer Testung der *in vivo* hergestellten und aufgereinigten Proteine WT 232 (PK) und R216H (zRK) etabliert, wobei sowohl die Phosphorylierung von ACV zu ACV-MP bzw. von dT zu dTMP als auch die Dephosphorylierung von ATP zu ADP quantifiziert werden konnte. Die Analyten lagen zum Messzeitpunkt in einem Gemisch mit den Bestandteilen des Phosphorylierungspuffers aus Tris-HCl, MgCl<sub>2</sub>, ATP und Protein vor. Deshalb war es notwendig, vor der Quantifizierung der Substanzen eine Standardprobe von 100 µM jedes Produktes zu analysieren. So konnten die spezifischen Retentionszeiten der Analyten bestimmt werden. Abbildung 35 stellt exemplarisch das Chromatogramm des Standards ATP mit einem Peak bei 3,54 min dar.



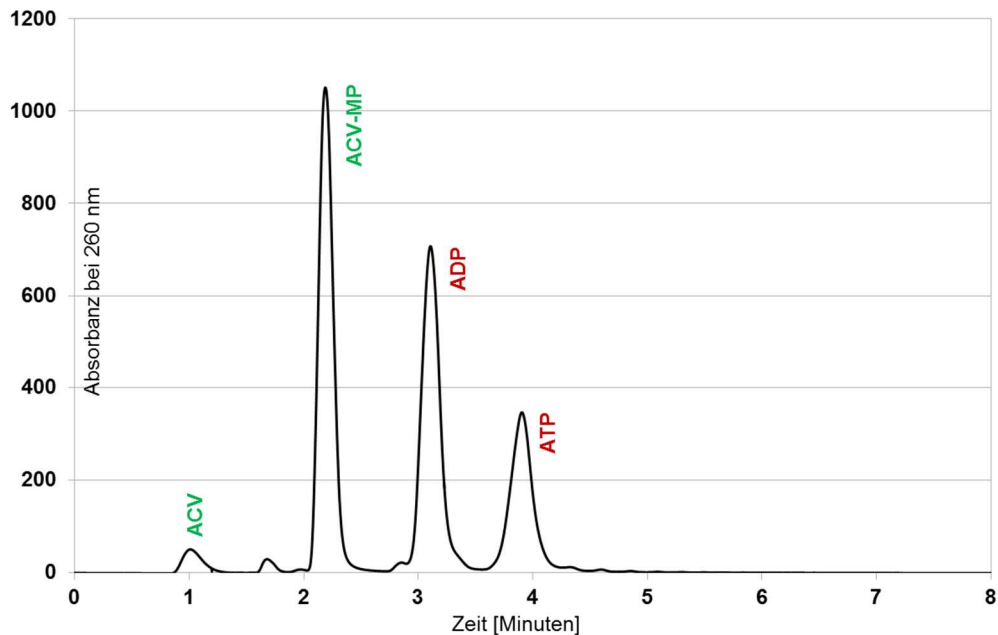
**Abb. 35:** Bestimmung der spezifischen Retentionszeit des Standards ATP mittels HPLC.

Die Ergebnisse für die Retentionszeiten aller Standardproben sind aus Tab. 43 ersichtlich.

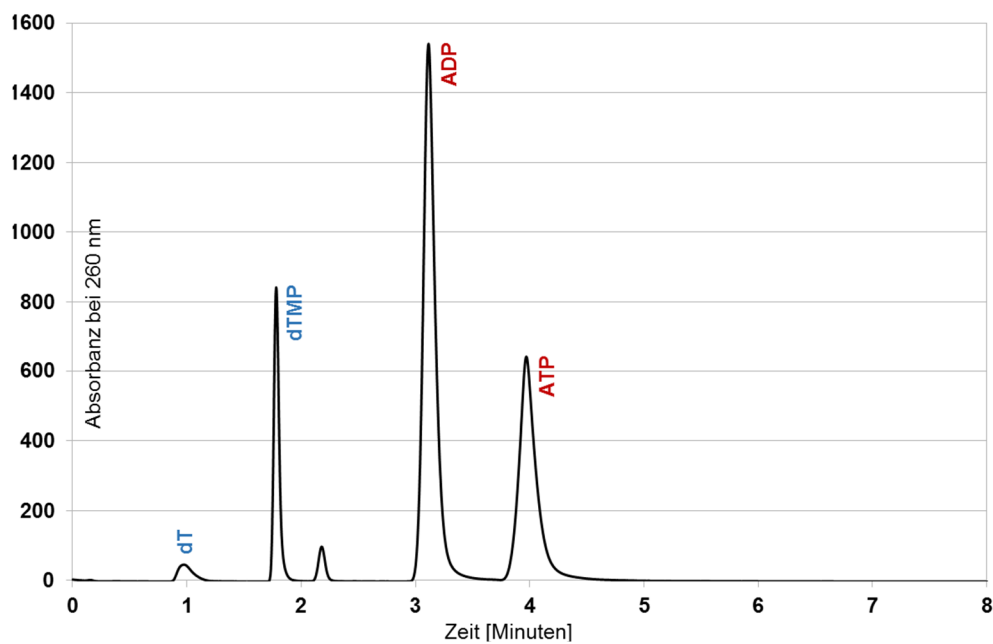
**Tab. 43:** Spezifische Retentionszeiten der Standardproben gemessen mittels HPLC/UV.

Analyt	Spezifische Retentionszeit [min]
ACV	1,0
ACV-MP	2,2
dT	1,0
dTMP	1,8
ATP	3,9
ADP	3,1

Da alle Proben in Dreifachbestimmungen analysiert wurden, wird an dieser Stelle exemplarisch jeweils ein Chromatogramm nach Inkubation der PK WT 232 mit ACV (Abb. 36) bzw. dT (Abb. 37) und der zRK R216H mit ACV (Abb. 38, S. 85) bzw. dT (Abb. 39, S. 85) gezeigt.



**Abb. 36:** Detektion von ACV, ACV-MP, ATP und ADP mittels HPLC/UV nach Inkubation der *in vivo* exprimierten und aufgereinigten PK WT 232 mit ACV.



**Abb. 37:** Detektion von dT, dTMP, ATP und ADP mittels HPLC/UV nach Inkubation der *in vivo* exprimierten und aufgereinigten PK WT 232 mit dT.

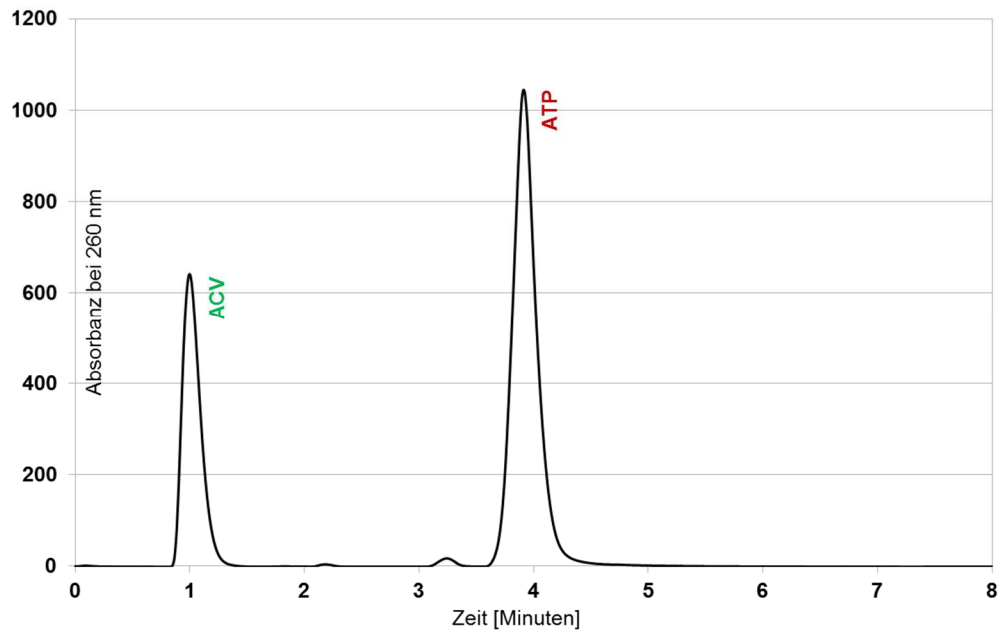


Abb. 38: Detektion von ACV, ACV-MP, ATP und ADP mittels HPLC/UV nach Inkubation der *in vivo* exprimierten und aufgereinigten zRK R216H mit ACV.

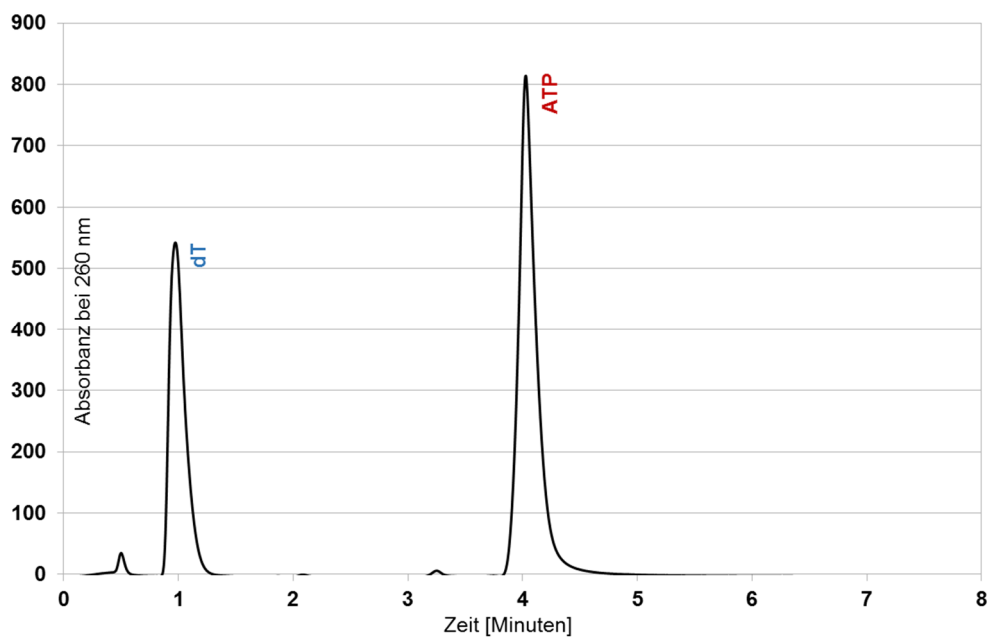


Abb. 39: Detektion von dT, dTMP, ATP und ADP mittels HPLC/UV nach Inkubation der *in vivo* exprimierten und aufgereinigten zRK R216H mit dT.

In den Abb. 36 und 37 (S. 84) ist zu erkennen, dass bei Einsatz des WT 232-Proteins der größte Teil des ACV zu ACV-MP bzw. dT zu dTMP umgesetzt wurde, während bei Verwendung des Enzyms mit der Substitution R216H (Abb. 38 und 39, S. 85) kein ACV-MP oder dTMP entstanden und nur ACV oder dT vorhanden ist. Entsprechend ist in den Proben mit WT 232 weniger ATP bzw. mehr ADP enthalten als in den Proben, in denen die RK eingesetzt wurde.

Mittels ValueSolution ChemSoftware gelang es, die einzelnen und mittleren prozentualen Anteile der Flächen unter den jeweiligen Peaks am gesamten Chromatogramm zu bestimmen. Aus diesen Werten konnten unter Einbeziehung der Anfangskonzentration an ACV die Endkonzentrationen an ACV und ACV-MP berechnet sowie näherungsweise  $k_{\text{cat}}$  bestimmt werden. Entsprechende Berechnungen ließen sich für die Umsetzung von dT zu dTMP anstellen. Während ACV und dT durch den WT 232 phosphoryliert wurden, blieb etwa 1/17 des ursprünglichen Gehaltes an ACV bzw. 1/7 an dT übrig. Der  $k_{\text{cat}}$ , der angibt, wie viele ACV- bzw. dT-Moleküle pro s von einer TK umgesetzt wurden, belief sich auf 0,013/s (ACV) bzw. 0,012/s (dT). Im Gegensatz hierzu hatte die RK mit dem AS-Austausch R216H weder ACV noch dT phosphoryliert, sodass der  $k_{\text{cat}}$  entsprechend 0,0/s betrug. Diese Ergebnisse sind in Tab. 44 und Tab. 45 (S. 87) dargestellt.

**Tab. 44: Mittels HPLC/UV ermittelte Konzentrationen an ACV, ACV-MP sowie Angabe des  $k_{\text{cat}}$  nach Inkubation der *in vivo* synthetisierten, aufgereinigten Proteine WT 232 (PK) und R216H (zRK) in Phosphorylierungspuffer mit ACV und ATP.**

MW: Mittelwert.

S: Standardabweichung.

Mutante	Durchlauf	ACV		ACV-MP		$k_{\text{cat}}$ [1/s]
		Peakfläche [%]	Konzentration [mM]	Peakfläche [%]	Konzentration [mM]	
WT 232	1	2,70	0,12	40,12	1,88	<b>0,013</b>
	2	2,72		40,18		
	3	2,74		40,17		
	MW	2,60		40,16		
	S	0,02		0,03		
R216H	1	31,33	2,00	0,00	0,00	<b>0,00</b>
	2	31,43		0,00		
	3	31,35		0,00		
	MS	31,37		0,00		
	S	0,05		0,00		



**Tab. 45:** Mittels HPLC/UV ermittelte Konzentrationen an dT, dTMP sowie Angabe des  $k_{cat}$  nach Inkubation der *in vivo* synthetisierten, aufgereinigten Proteine WT 232 (PK) und R216H (zRK) in Phosphorylierungspuffer mit dT und ATP.

MW: Mittelwert.

S: Standardabweichung.

Mutante	Durchlauf	dT		dTMP		$k_{cat}$ [1/s]
		Peakfläche [%]	Konzentration [mM]	Peakfläche [%]	Konzentration [mM]	
WT 232	1	2,15	0,29	12,60	1,71	<b>0,012</b>
	2	2,11		12,61		
	3	2,10		12,55		
	MW	2,12		12,59		
	S	0,02		0,03		
R216H	1	36,35	2,00	0,00	0,00	<b>0,00</b>
	2	36,14		0,00		
	3	36,27		0,00		
	MS	36,25		0,00		
	S	0,11		0,00		

Zur Überprüfung dieser Werte wurde dieselbe Berechnung mit ATP und ADP vorgenommen, wobei vergleichbare Ergebnisse zu erwarten waren. Die Ergebnisse dieser Kalkulationen befinden sich in Tab. 46. Entsprechend der Phosphorylierung von ACV bzw. dT zu ACV-MP bzw. dTMP durch die PK WT 232 wurde hier ATP zu ADP dephosphoryliert. Die zRK R216H zeigte ATP wie schon ACV und dT gegenüber keine Aktivität.

**Tab. 46:** Mittels HPLC/UV ermittelte Konzentrationen an ATP, ADP sowie Angabe des  $k_{cat}$  nach Inkubation der *in vivo* synthetisierten, aufgereinigten Proteine WT 232 (PK) und R216H (zRK) in Phosphorylierungspuffer mit ACV oder dT.

MW: Mittelwert.

S: Standardabweichung.

Mutante	Durchlauf	ATP		ADP		$k_{cat}$ [1/s]
		Peakfläche [%]	Konzentration [mM]	Peakfläche [%]	Konzentration [mM]	
WT 232 (ACV)	1	20,16	1,85	34,63	3,15	<b>0,021</b>
	2	20,26		34,50		
	3	20,05		34,00		
	MW	20,16		34,38		
	S	0,11		0,33		
WT 232 (dT)	1	31,43	1,89	51,86	3,11	<b>0,021</b>
	2	31,26		51,60		
	3	31,26		51,68		
	MW	31,32		51,71		
	S	0,010		0,14		

Fortsetzung Tab. 46.

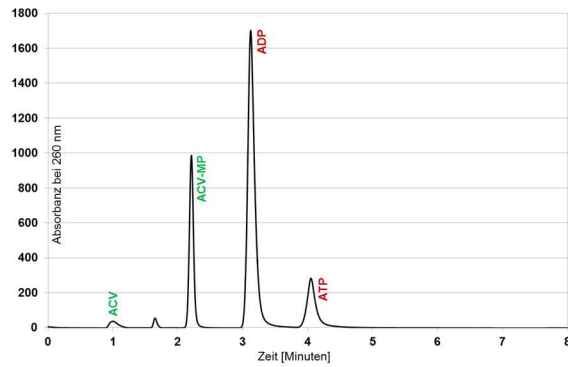
Mutante	Durchlauf	ATP		ADP		$k_{\text{cat}}$ [1/s]
		Peakfläche [%]	Konzentration [mM]	Peakfläche [%]	Konzentration [mM]	
<b>R216H (ACV)</b>	1	67,54	5,00	0,00	0,00	<b>0,00</b>
	2	67,34		0,00		
	3	67,66		0,00		
	MS	67,51		0,00		
	S	0,16		0,00		
<b>R216H (dT)</b>	1	61,49	5,00	0,00	0,00	<b>0,00</b>
	2	61,94		0,00		
	3	61,65		0,00		
	MS	61,69		0,00		
	S	0,23		0,00		

Auf Basis der für ACV-MP bzw. dTMP kalkulierten Konzentrationen wurden Cut-off-Werte, wie in Tab. 47 dargestellt, festgelegt. Hierbei galt als Grenzwert für schwach positive Aktivität 10% der ACV-MP- bzw. dTMP-Konzentration nach Inkubation des WT 232 mit ACV bzw. dT.

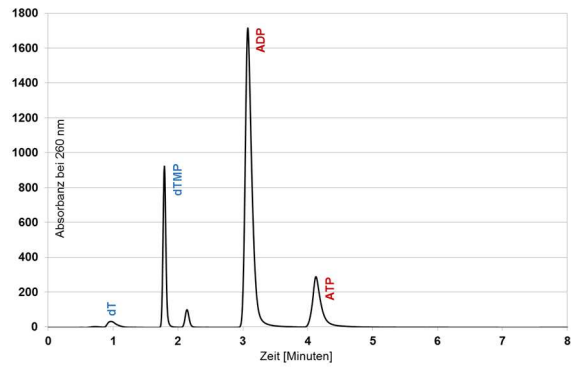
Tab. 47: Bewertung der TK-Aktivität der *in vivo* synthetisierten, aufgereinigten Proteine mittels HPLC/UV gegenüber ACV bzw. dT.

Bewertung der TK-Aktivität	ACV-MP-Konzentration	dTMP-Konzentration
negativ	0,0 mM	0,0 mM
schwach positiv	> 0,0 mM und $\leq$ 0,19 mM	> 0,0 mM und $\leq$ 0,17 mM
positiv	> 0,19 mM	> 0,17 mM

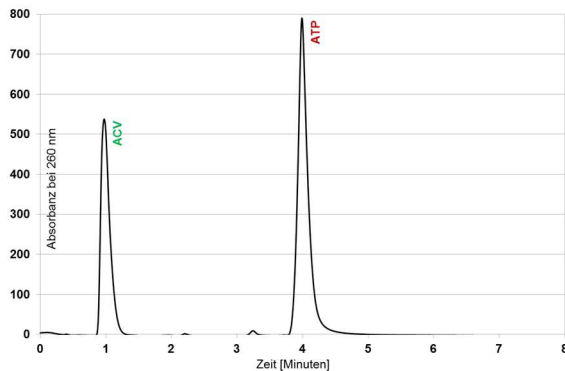
Zudem wurden drei weitere Proteine zusätzlich mittels HPLC/UV überprüft, wobei jeweils ein Protein mit positiver, eines mit schwach positiver und eines mit negativer Phosphorylierungsaktivität im DiviTum<sup>TM</sup>-Test gewählt worden war: Die TK mit dem AS-Austausch R32H hatte sich – widersprüchlich zu Schubert et al. (2014) – als natürlicher Polymorphismus präsentiert. Für das Protein mit der AS-Substitution N244H war eine schwach positive Phosphorylierungsaktivität kalkuliert worden. Die Phosphorylierungsaktivität des Proteins mit dem Austausch G264V lag im DiviTum<sup>TM</sup>-Test zwar eindeutig bei 0,0 DU/l, es sollte jedoch geprüft werden, ob es sich um eine Mutante ohne TK-Aktivität (TK<sup>-</sup>), mit reduzierter Phosphorylierungsaktivität (TK<sup>R</sup>) oder um ein Protein mit veränderter Substratspezifität (TK<sup>A</sup>) handelte. Da auch hier mittels Dreifachbestimmung analysiert wurde, ist aus den Abb. 40 bis 45 (S. 89) jeweils ein Chromatogramm je Probe ersichtlich.



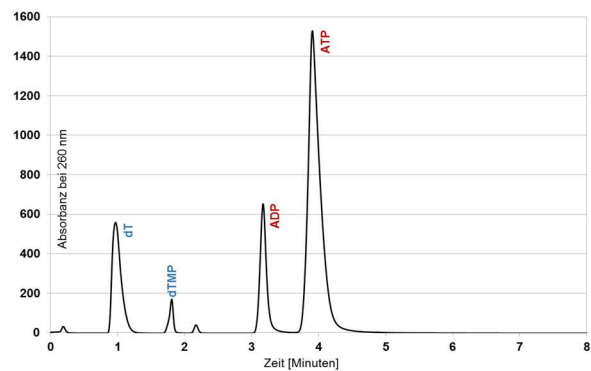
**Abb. 40:** Detektion von ACV, ACV-MP, ATP und ADP mittels HPLC/UV nach Inkubation des *in vivo* exprimierten und aufgereinigten Proteins mit der AS-Substitution R32H mit ACV.



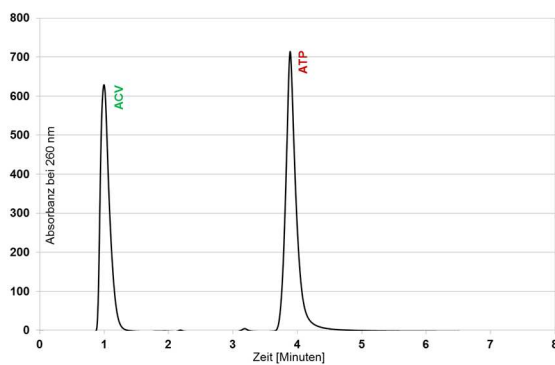
**Abb. 41:** Detektion von dT, dTMP, ATP und ADP mittels HPLC/UV nach Inkubation des *in vivo* exprimierten und aufgereinigten Proteins mit der AS-Substitution R32H mit dT.



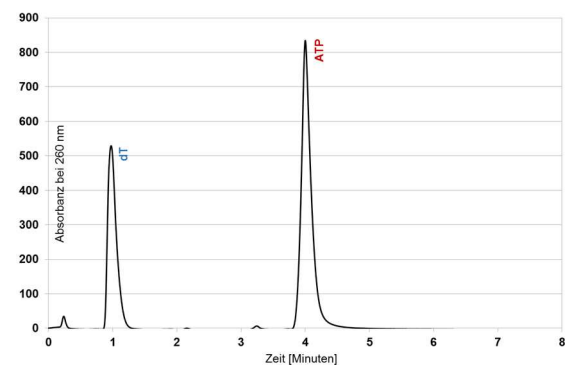
**Abb. 42:** Detektion von ACV, ACV-MP, ATP und ADP mittels HPLC/UV nach Inkubation des *in vivo* exprimierten und aufgereinigten Proteins mit der AS-Substitution N244H mit ACV.



**Abb. 43:** Detektion von dT, dTMP, ATP und ADP mittels HPLC/UV nach Inkubation des *in vivo* exprimierten und aufgereinigten Proteins mit der AS-Substitution N244H mit dT.



**Abb. 44:** Detektion von ACV, ACV-MP, ATP und ADP mittels HPLC/UV nach Inkubation des *in vivo* exprimierten und aufgereinigten Proteins mit der AS-Substitution G264V mit ACV.



**Abb. 45:** Detektion von dT, dTMP, ATP und ADP mittels HPLC/UV nach Inkubation des *in vivo* exprimierten und aufgereinigten Proteins mit der AS-Substitution G264V mit dT.

Das Protein mit dem Austausch R32H zeigte auch bei Analyse der Aktivität mittels HPLC/UV eine deutlich positive Aktivität. Im Gegensatz dazu wies das Protein mit dem AS-Austausch G264V eine negative Phosphorylierungsaktivität sowohl gegenüber ACV als auch dT auf. Die Substitution N244H zeigte keine Aktivität gegenüber ACV, phosphorylierte jedoch etwa 1/8 des dTs zu dTMP. Aufgrund dieser Ergebnisse erfolgte die abschließende Einteilung der AS-Substitutionen: R32H stellt einen natürlichen Polymorphismus dar, während sich N244H als TK<sup>A</sup>- und G264V als TK<sup>-</sup>-Mutante präsentiert. Diese Ergebnisse sind aus Tab. 48 ersichtlich.

**Tab. 48:** Mittels HPLC/UV erhaltene Ergebnisse für ACV-MP sowie Angabe des  $k_{cat}$  nach Inkubation der *in vivo* synthetisierten, aufgereinigten Proteine R32H, N244H und G264V in Phosphorylierungspuffer mit ACV oder dT und ATP.

MW: Mittelwert.

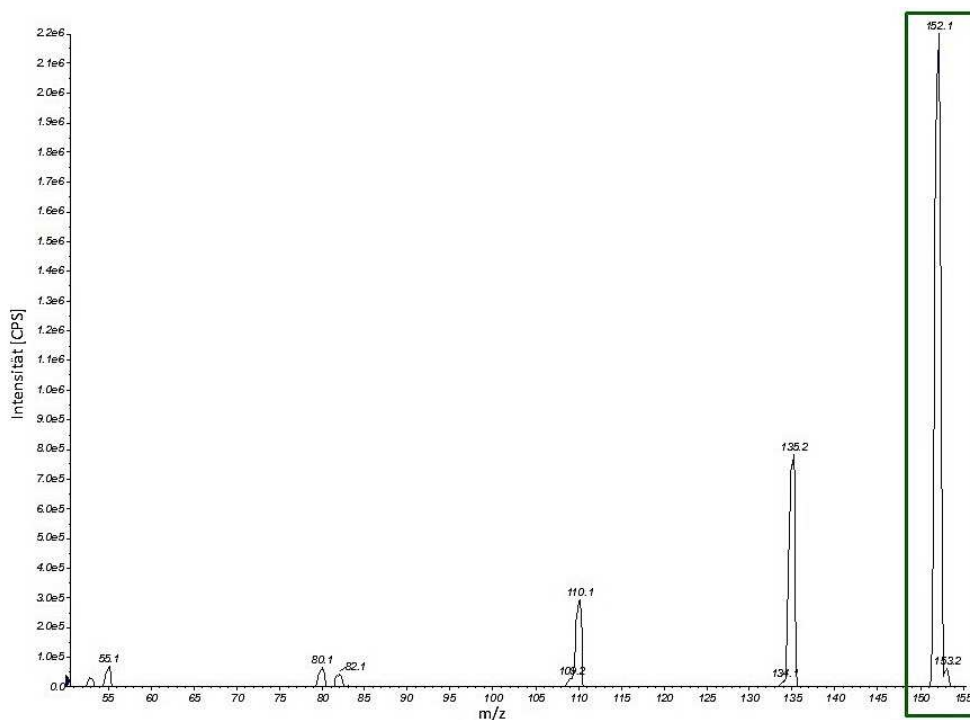
S: Standardabweichung.

Mutante	Durchlauf	ACV-MP		dTMP		$k_{cat}$ [1/s] für ACV/dTMP	TK-Aktivität	Bewertung der TK
		Peakfläche [%]	Konzentration [mM]	Peakfläche [%]	Konzentration [mM]			
R32H	1	21,24	1,84	14,99	1,77	0,012/ 0,012	ACV: positiv/ dTMP: positiv	TK <sup>+</sup>
	2	21,15		15,03				
	3	21,16		15,24				
	MW	21,19		15,09				
	S	0,05		0,13				
N244H	1	0,00	0,00	2,46	0,25	0,00/ 0,0017	ACV: negativ/ dTMP: positiv	TK <sup>A</sup>
	2	0,00		2,46				
	3	0,00		2,50				
	MW	0,00		2,47				
	S	0,00		0,03				
G264V	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00/ 0,00	ACV: negativ/ dTMP: negativ	TK <sup>-</sup>
	2	0,00		0,00				
	3	0,00		0,00				
	MS	0,00		0,00				
	S	0,00		0,00				

## 5.7 Flüssigchromatographie/Massenspektrometrie

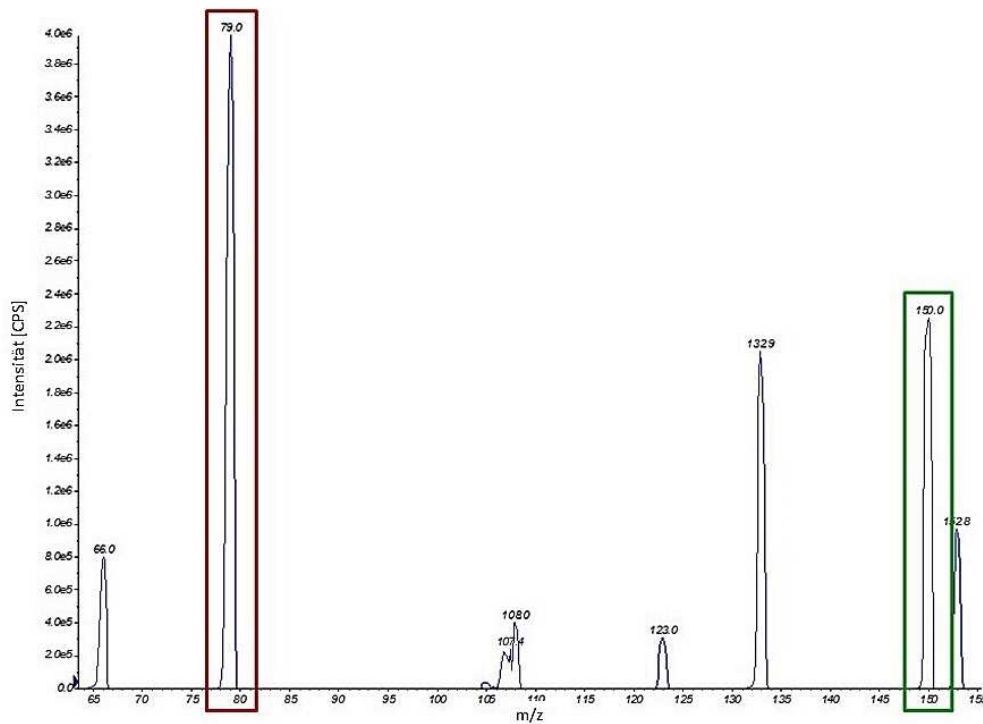
Als zweite alternative Methode zur Ermittlung der TK-Phosphorylierungsaktivität gegenüber ACV wurde LC/MS/MS verwendet. Vor Durchführung der Versuche konnten durch die Analyse von Standardlösungen aus ACV bzw. ACV-MP sowohl die Retentionszeiten von jeweils 1,8 min als auch die spezifischen Massenübergänge bestimmt werden. In den Abb. 46 (S. 91) und 47 (S. 92) sind die Fragmentprofile für ACV bzw. ACV-MP darge-

stellt. Diese zeigen die  $m/z$  der Fragmente, die nach der Fragmentation von ACV bzw. ACV-MP in der zweiten Kammer des Massenspektrometers entstanden sind. Aufgrund dieses  $m/z$  wurden die Ionen in der dritten Kammer selektiert. Bei ACV wurde das Fragment, das in der Messung mit einem  $m/z$  von 152,1 (Abb. 46) die höchste Intensität gezeigt hatte, verwendet. Das Fragment der Phosphat-Gruppe des ACV-MP mit einem  $m/z$  von 79,0 (Abb. 47, S. 92) konnte hingegen nicht für die endgültige Analyse benutzt werden, obwohl es die höchste Intensität gezeigt hatte. Da es auch von anderen Substanzen mit Phosphatgruppe im Puffer, wie zum Beispiel ATP, stammen könnte, wurde es als unspezifisch eingestuft. Aus diesem Grund diente hier das Fragment mit der nächsthöheren Intensität, das ein  $m/z$  von 150,0 zeigte, zur Auswertung. Da ACV und ACV-MP nach der ESI jeweils einfach geladen sind, ergibt sich ein spezifischer Massenübergang für ACV von 226,1/152,1 und für ACV-MP von 303,9/150,0.



**Abb. 46: Fragmentprofil von ACV in der LC/MS/MS.**

Das zur Auswertung verwendete Fragment ist grün umrahmt.



**Abb. 47: Fragmentprofil von ACV-MP in der LC/MS/MS.**

Das zur Auswertung verwendete Fragment ist grün, die unspezifische Phosphatgruppe rot umrahmt.

Anschließend gelang es, exemplarisch die Konzentration von ACV und ACV-MP nach Inkubation der aufgereinigten WT-TK in Phosphorylierungspuffer sowie der aufgereinigten zRK R216H mittels LC/MS/MS zu bestimmen. Zum Vergleich wurde auch die nicht aufgereinigte WT 232-TK bei gleicher sowie 10facher Gesamtproteinkonzentration getestet, wobei bei gleicher Konzentration kein ACV-MP detektierbar war. Durch die Hydrophobizität sowie das m/z wurden die Analyten mittels LC bzw. MS separiert und anschließend die Signalintensität der Ionen gemessen. In den Abb. 48 bis 53 (S. 93 - 94) sind die gewonnenen Spektren zu sehen. Die blau gefärbten Peaks bei rund 1,8 min repräsentieren ACV bzw. ACV-MP. Da ACV positiv und ACV-MP negativ ionisiert wurde, konnten beide unterschieden werden.

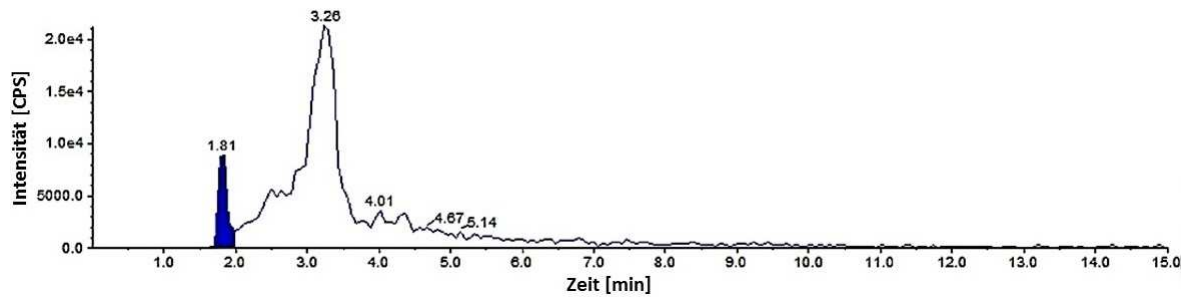


Abb. 48: Spektrum nach Inkubation von ACV mit der aufgereinigten PK WT 232 bei Messung von ACV (positive Ionisierung).

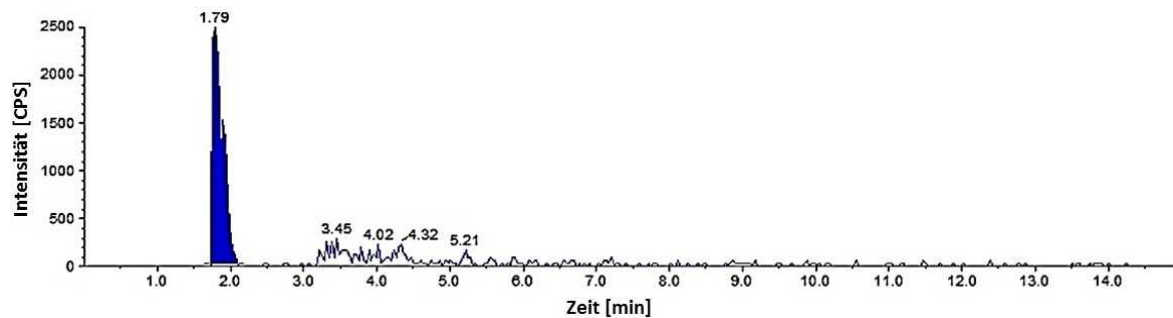


Abb. 49: Spektrum nach Inkubation von ACV mit der aufgereinigten PK WT 232 bei Messung von ACV-MP (negative Ionisierung).

Bei Betrachtung der Abb. 48 und 49 zeigt sich, dass ACV durch das aufgereinigte WT 232-Protein (PK) zu ACV-MP umgesetzt wurde, wobei das Substrat ACV nicht vollständig verbraucht wurde. Es ist zu beachten, dass nach der positiven Ionisierung zur Messung von ACV 30  $\mu$ l statt 10  $\mu$ l der Probe in das Massenspektrometer injiziert wurden, da bei der Verwendung von nur 10  $\mu$ l kein auswertbarer Peak gemessen werden konnte. Aus diesem Grund sind die Kurven für ACV und ACV-MP nicht direkt vergleichbar.

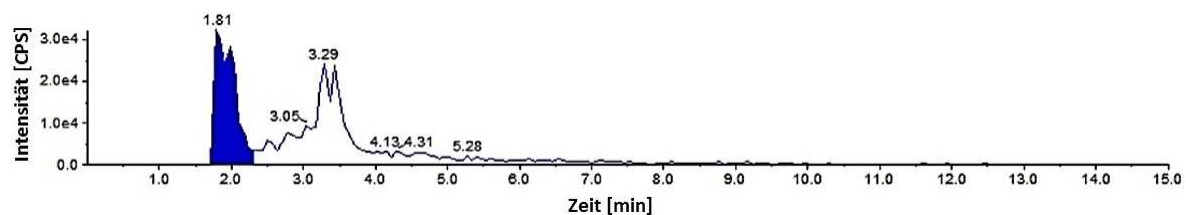


Abb. 50: Spektrum nach Inkubation von ACV mit dem nicht aufgereinigten WT 232-Proteingemisch bei Messung von ACV (positive Ionisierung).

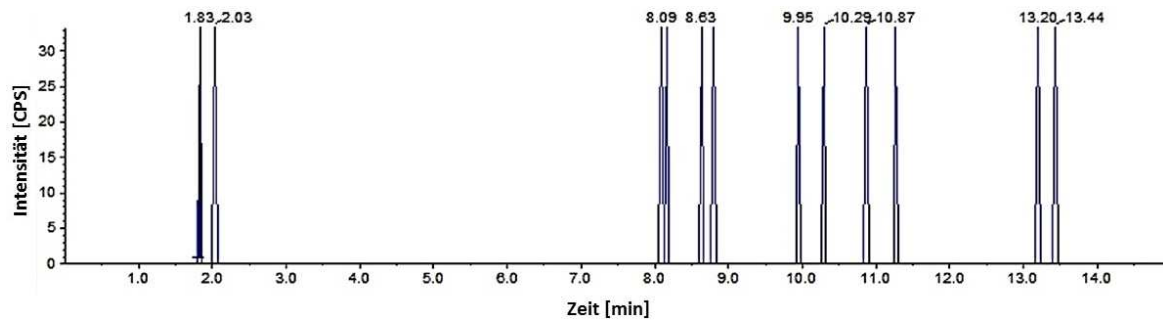


Abb. 51: Spektrum nach Inkubation von ACV mit dem nicht aufgereinigten WT 232-Proteingemisch bei Messung von ACV-MP (negative Ionisierung).

Im Vergleich hierzu sind in den Abb. 50 (S. 93) und 51 die Chromatogramme nach Inkubation der zehnfachen Menge an nicht aufgereinigtem WT 232-Protein zu erkennen. Es fällt auf, dass mehr ACV vorhanden ist als bei der Verwendung aufgereinigter Proteine. Der Peak bei der Messung von ACV-MP bei 1,83 min hebt sich trotz der bedeutend höheren Menge an Gesamtprotein nicht von der Hintergrundaktivität ab.

Die Abb. 52 und 53 stellen die Spektren nach Verwendung der aufgereinigten zRK R216H dar. Es ist eindeutig zu sehen, dass in diesem Fall kein ACV phosphoryliert wurde, sodass kein ACV-MP, sondern nur ACV detektierbar ist.

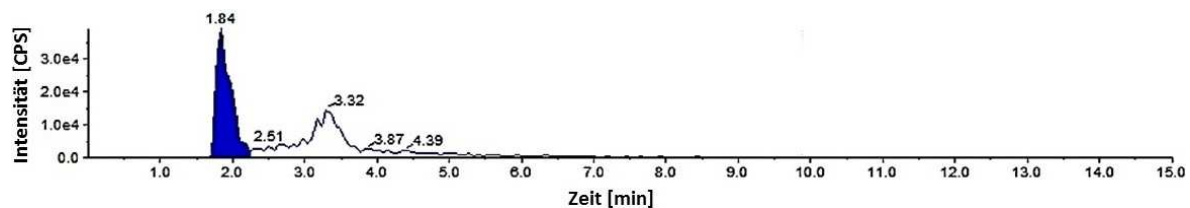


Abb. 52: Spektrum nach Inkubation von ACV mit der aufgereinigten zRK R216H bei Messung von ACV (positive Ionisierung).

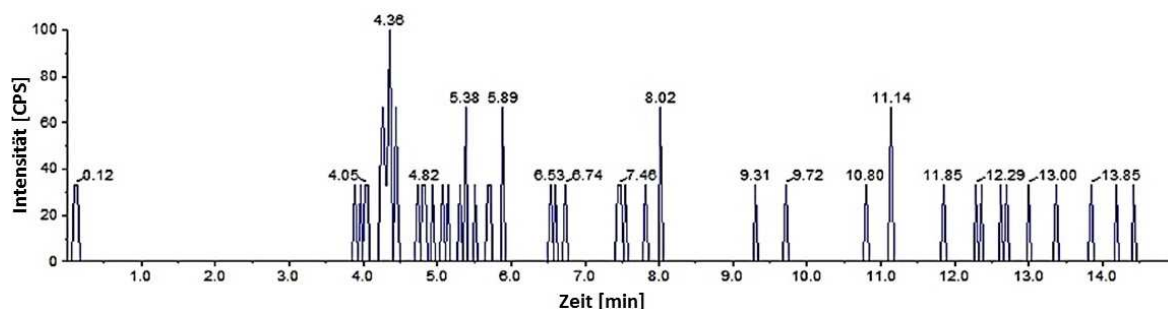


Abb. 53: Spektrum nach Inkubation von ACV mit der aufgereinigten zRK R216H bei Messung von ACV-MP (negative Ionisierung).



Die Hintergrundaktivität in allen Chromatogrammen sowie der hohe Peak, der in den positiv ionisierten Proben (Abb. 46, S. 91, Abb. 48, S. 93 und Abb. 50, S. 93) bei etwa 3,2 min zu erkennen ist, sind auf Messunregelmäßigkeiten und das Vorhandensein störender Substanzen im Puffer zurückzuführen. Die Stoffmenge der Analyten ist durch die Fläche unter der Kurve charakterisiert, die mittels der Software Analyst 1.4 kalkuliert wurde und in Tab. 49 aufgeführt ist.

**Tab. 49: Mittels LC/MS/MS ermittelte Konzentrationen an ACV und ACV-MP nach Inkubation der aufgereinigten Proteine WT 232 (PK) und R216H (zRK) sowie des nicht aufgereinigten Proteins WT 232 in Phosphorylierungspuffer mit ACV und ATP.**

<b>Protein</b>	<b>Fläche unter der Kurve von ACV [CPS*s]</b>	<b>Fläche unter der Kurve von ACV-MP [CPS*s]</b>
<b>WT 232 (aufgereinigt)</b>	80800 (26933)*	24400
<b>WT 232 (nicht aufgereinigt)</b>	638000	64
<b>R216H (aufgereinigt)</b>	599000	0

\*Da bei dieser Messung 30 µl Probe in das Massenspektrometer injiziert worden waren, ist in Klammern der für 10 µl Probe extrapolierte Wert zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse angegeben.

Wie schon beim DiviTum<sup>TM</sup>-Test zeigten auch hier die nicht aufgereinigten Proteine nur einen Bruchteil der Phosphorylierungsaktivität (0,26%) der aufgereinigten Proteine. Darüber hinaus muss beachtet werden, dass 10 µg/µl an nicht aufgereinigtem Protein im Vergleich zu nur 0,1 µg/µl aufgereinigtem Protein eingesetzt worden waren. Es zeigte sich, dass die auf diese Weise erhaltenen Ergebnisse trotz wiederholter Versuche nicht reproduzierbar waren. Aus diesem Grund konnte keine Standardreihe erstellt werden, sodass es nicht möglich war, die genaue Konzentration an ACV und ACV-MP zu berechnen.

## 6 Diskussion

Während der herpesviralen Replikation können spontan auftretende Mutationen zu Resistenzen gegen Nukleosid-Analoga wie ACV führen. Diese treten zu 95% im TK-Gen auf, da es nicht für essentielle Funktionen während der Replikation kodiert (Bestman-Smith et al. 2001, Morfin und Thouvenot 2003). In nur 5% der Fälle sind Resistenzen mit Mutationen im DNA-Pol-Gen assoziiert (Larder und Darby 1985). Zudem treten diese häufig in konservierten und aktiven Genbereichen auf (Bohn et al. 2011), da so meist Änderungen der Konformation (Evans et al. 1998), der Bindungseigenschaften (Liu und Summers 1988) oder der Substratspezifität (Larder et al. 1983) des Enzyms entstehen. Bevor ein AS-Austausch jedoch als Polymorphismus oder Resistenz-assoziiert klassifiziert werden darf, muss seine Auswirkung auf die Phosphorylierungsaktivität der TK eindeutig geklärt werden (Sauerbrei et al. 2011). Dies ist in vielen Fällen durch einen Abgleich der Ergebnisse aus geno- und phänotypischen Testungen möglich. Liegen allerdings durch die hohe Polymorphismusrate der TK- und DNA-Pol-Gene neben einer unbekannten AS-Substitution weitere unklare Austausche oder eine bereits bekannte Resistenz-assoziierte Mutation vor, kann keine Aussage über die Auswirkungen der fraglichen Substitution getroffen werden. Zudem ist die Charakterisierung dieser nicht möglich, wenn das Virus in der Zellkultur aufgrund einer zu niedrigen Viruslast nicht angezüchtet werden kann (Sauerbrei et al. 2010a). Daher muss in vielen Fällen auf weiterführende Methoden zurückgegriffen werden, um die Bedeutung unklarer AS-Austausche für eine ACV-Resistenz zu klären. Hierfür kommen beispielsweise die Verwendung rekombinanter Viren (Bestman-Smith und Boivin 2003, Piret et al. 2015, Brunnemann et al. 2016) oder der Einsatz von Mutagenese, Klonierung und der Herstellung rekombinanter Enzyme (Frobert et al. 2005, Sauerbrei et al. 2012) in Frage.

In der vorliegenden Arbeit wurden neun literaturunbekannte und elf bekannte, aber unklare AS-Substitutionen im TK-Gen des HSV-1 hinsichtlich ihrer Bedeutung für eine ACV-Resistenz getestet. Die Patientenstämme mit diesen AS-Austauschen waren zuvor phäno- und genotypisch analysiert worden. Eine Ausnahme bildet hierbei der Stamm 275-11, der in der TK die unbekannte AS-Substitution R20C enthält. In diesem Fall erwies sich die Viruslast des Patientenmaterials als zu gering für eine Anzucht. Folglich konnte weder die DNA-Pol sequenziert noch das phänotypische Verhalten gegenüber ACV bestimmt werden. Genotypisch lagen bei allen anderen Stämmen zusätzlich zu den in dieser Arbeit untersuchten AS-Substitutionen Resistenz- bzw. unbekannte oder unklare Mutationen im TK- oder DNA-Pol-Gen vor. Phänotypisch wurden die Stämme mit Ausnahme der Patientenstämme 185-93 und

05-14 als ACV-resistent getestet. Der ACV-sensitive Stamm 185-93 enthält den AS-Austausch A156V (Schmidt et al. 2015). Diese Substitution trat darüber hinaus in der TK des ACV-resistenten Stammes 3571-09 auf, der keine weitere unklare oder Resistenzmutation beinhaltet (Sauerbrei et al. 2011). Aus diesem Grund wurde eine mögliche Resistenzassoziation dieser Substitution erneut abgeklärt. Der Stamm 05-14 mit fraglichem phänotypischem Befund enthielt im TK-Gen die AS-Substitutionen M121K, N244H sowie V238F. Aufgrund dieser Unklarheiten der phänotypischen Ergebnisse wurden alle drei AS-Austausche mittels DiviTum<sup>TM</sup>-Assay überprüft.

Das Mitführen mehrerer Kontrollproben im Western Blot, beim DiviTum<sup>TM</sup>-Aktivitätstest und bei den chromatographischen sowie massenspektrometrischen Messungen ermöglichte die Interpretation der erhaltenen Ergebnisse. Als PK diente das rekombinante Protein WT 232, das im TK-Gen nur natürliche Genpolymorphismen enthielt (Sauerbrei et al. 2012), während die NK durch den Vektor pIX3.0 ohne TK-Gen-Insert dargestellt wurde. Die TK-Proteine mit den Resistenzmutationen Q250Stopp (Sauerbrei et al. 2011) für den DiviTum<sup>TM</sup>-Test bzw. R216H (Stránská et al. 2004, van Velzen et al. 2013) für HPLC/UV und LC/MS/MS realisierten die RKs. Als zPKs im DiviTum<sup>TM</sup>-Test dienten TK-Proteine mit den AS-Substitutionen A156P bzw. P268M. Diese konnten durch Abgleich von Geno- und Phänotyp als natürliche Polymorphismen charakterisiert werden (Schmidt et al. 2015). Um zRKs für den DiviTum<sup>TM</sup>-Assay zu erhalten, wurden rekombinante Plasmide mit den bereits literaturbekannten Resistenzmutationen L170P (Burrel et al. 2010, Burrel et al. 2012), S181N (Duan et al. 2008) sowie T183Stopp (Gaudreau et al. 1998) und R216H (Stránská et al. 2004, van Velzen et al. 2013) generiert.

## 6.1 Herstellung und Überprüfung rekombinanter Proteine

Um die unbekannten bzw. unklaren AS-Substitutionen zu charakterisieren, musste zuerst der jeweilige Basenaustausch mittels ortsspezifischer Mutagenese in das HSV-1-TK-Gen des WT 232 eingebracht werden. Dieses Gen war bereits zuvor in den Vektor pIX3.0 kloniert worden. Nach anschließender Rekombination, Transformation in *E. coli* und Isolation der Plasmid-DNA erfolgte die Sequenzierung. Bei der Auswertung der Sequenzierdaten zeigte sich in drei Fällen zusätzlich zu dem gewünschten AS-Austausch jeweils eine unbekannte Substitution. Es besteht die Möglichkeit, dass diese bereits während des Mutagenese-Prozesses durch einen Fehler der AccuPrime<sup>TM</sup> Pfx Taq Pol eingebaut wurde, die allerdings

Proofreading-Exonuklease-Aktivität und somit eine sehr geringe Fehlerrate von  $2,9 \times 10^{-4}\%$  besitzt (Invitrogen Life Technologies 2002). Im weiteren Verlauf könnten die AS-Substitutionen auch erst nach der Transformation in *E. coli*, während der bakteriellen Replikation durch die DNA-Pol III, aufgetreten sein. Diese Pol besitzt allerdings durch ihre Proofreading-Aktivität ebenfalls eine sehr niedrige Fehlerrate von  $10^{-4}\%$  bis  $10^{-6}\%$  (Kunkel 2004). Wahrscheinlicher ist, dass die unerwünschten AS-Substitutionen während der HotStar-PCR nach der Mini-Präparation entstanden sind. Die hier verwendete HotStar Taq<sup>TM</sup> besitzt keine Proofreading-Funktion, was in einer höheren Fehlerquote von  $4,4 \times 10^{-3}\%$  resultiert (Invitrogen Life Technologies 2002). Um Fehler in den weiteren Analysen durch diese Substitutionen auszuschließen, wurden die betroffenen Klone verworfen, eine andere Bakterienkolonie zur Herstellung rekombinanter DNA verwendet oder eine erneute Mutagenese-PCR durchgeführt. Anschließend zeigten sich nach der Sequenzierung nur die gewünschten AS-Austausche.

#### ➤ Zellfreie Synthese rekombinanter Proteine

Nach der genotypischen Kontrolle der Plasmide konnte die *in vitro* Synthese rekombinanter Proteine erfolgen. Diese wurde für neun Proteine mittels EasyXpress<sup>®</sup> Protein Synthesis Kit (Qiagen-Kit) und für 17 mittels AccuRapid<sup>TM</sup> Cell-Free Protein Expression Kit (Bioneer-Kit) durchgeführt. Die Kontrollproben WT 232, pIX3.0 und Q250Stopp wurden jeweils mit beiden Kits hergestellt. Zur Kalkulation der Proteinkonzentration erfolgte anschließend ein Bradford-Assay. Hierbei zeigte sich eine deutlich höhere Konzentration bei Proteinen aus dem Bioneer-Kit. Auch im Western Blot konnten bei Einsatz dieses Kits stärkere Banden detektiert werden als bei Proteinen aus dem Qiagen-Kit. Darüber hinaus wies die PK WT 232 nach Herstellung mittels Bioneer-Kit im DiviTum<sup>TM</sup>-Test eine etwa sechsfach höhere Aktivität auf als nach Synthese mittels Qiagen-Kit bei Einsetzen der gleichen Proteinmenge. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass mittels Bioneer-Kit eine höhere Ausbeute an TK-Protein im Verhältnis zu unerwünschten, bakteriellen Proteinen gewonnen werden kann. Dennoch besteht vermutlich ein nur sehr kleiner Teil des Proteingemischs aus der gewünschten TK. Dies zeigt sich beim Vergleich der Phosphorylierungsaktivitäten der nicht aufgereinigten WT-TK aus dem Bioneer-Kit mit dem *in vivo* exprimierten, aufgereinigten Enzym mittels DiviTum<sup>TM</sup>-Test: Beim Einsetzen der gleichen absoluten Proteinmenge wies das nicht aufgereinigte Kontrollprotein nur 1,5% der Aktivität des aufgereinigten WT-Proteins auf. Weiterhin wurde eine Probe nicht aufgereinigter TK-WT-Proteine mittels LC/MS/MS analysiert. Wie auch schon

beim DiviTum<sup>TM</sup>-Test zeigten die nicht aufgereinigten Proteine nur einen Bruchteil der Aktivität aufgereinigter Proteine (0,26%). Dabei muss auch beachtet werden, dass im Vergleich zu 0,1 µg/µl aufgereinigter TK sogar 10 µg/µl an nicht aufgereinigtem Proteinen eingesetzt worden waren. Dieses Ergebnis untermauert die Hypothese, dass nur ein kleiner Teil des zellfrei synthetisierten Proteingemischs aus rekombinanter TK besteht. Trotz des zusätzlichen Arbeitsaufwandes ist es deshalb zu empfehlen, die hergestellten, rekombinanten TK-Proteine vor der Bestimmung ihrer Aktivität aufzureinigen, falls es die Proteinmenge erlaubt.

Mittels Western Blot konnte nachgewiesen werden, dass alle rekombinanten Proteine die TK enthielten. Es zeigten sich jeweils Doppelbanden bei 39 und 43 kDa, wobei die Banden bei 39 kDa vermutlich eine Isoform des Enzyms darstellten (Sauerbrei et al. 2012). Diese kommen durch die Nutzung dreier unterschiedlicher Startcodons bei der Initiierung der Proteinsynthese zustande. Proteine mit 39 bzw. 38 kDa entstehen, wenn das erste bzw. die ersten beiden Startcodons umgangen werden (Kozak 1981, Marsden et al. 1983). Ein Western Blot, bei dem der His<sub>6</sub>-tag des WT 232 detektiert wurde, zeigte ausschließlich die Bande bei 43 kDa. Im Gegensatz hierzu lagen die Doppelbanden nach der Aufreinigung mittels *Strep-Tactin*<sup>®</sup> Säulen noch vor. Auch diese Ergebnisse sprechen für das Vorliegen von TK-Isoformen, da bei Umgehen des ersten bzw. der ersten beiden Startcodons der His<sub>6</sub>-tag am N-Terminus nicht, der Strep-tag am C-Terminus hingegen schon translatiert wird. Die Bandengröße der TK von 43 kDa anstelle des Literaturwertes von 41 kDa (Wagner et al. 1981) ist durch die zusätzlichen Adaptersequenzen zu erklären. Auch die Proteine N376Stopp und P173Deletion waren im anti-TK-Western Blot auf etwa dieser Höhe zu erkennen, da eine Verkürzung um nur eine AS keine sichtbare Änderung der Bandenhöhe hervorruft. Im Gegensatz hierzu konnte die RK für den DiviTum<sup>TM</sup>-Test, das Protein mit der Mutation Q250Stopp, bei etwa 28 kDa sowie die zRK T183Stopp bei ca. 20 kDa identifiziert werden. Bei einem durchschnittlichen Molekulargewicht einer Aminosäure von 110 Da (Mousseau und Ravavendra Rao 1999) und unter Berücksichtigung der Molekülmasse der Adaptersequenzen stimmt die Höhe dieser Banden mit dem zu erwartenden Wert überein. Für die NK wurden ausschließlich bakterielle Proteine, jedoch keine Bande bei dem Molekulargewicht der TK detektiert, da der Vektor pIX3.0 kein TK-Gen-Insert besitzt.

Beim Auftragen von Proteinen aus dem Bioneer-Kit zeigten sich zusätzlich zu den *E. coli*-Proteinen, die beim Qiagen-Kit ermittelt wurden, Proteine in zwei weiteren Größen. Dies ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die unterschiedliche Zusammensetzung der *E. coli*-Extrakte

der beiden Kits zurückzuführen. Bei den übrigen, TK-positiven Proben wurden ebenfalls Banden in der Größe der *E. coli*-Proteine identifiziert. Dies kommt durch den polyklonalen Primär-AK zu Stande. Die Verwendung eines monoklonalen AK, der gegen die herpesvirale TK gerichtet ist, könnte dieses Problem beheben, jedoch ist zurzeit kein solches Produkt auf dem Markt verfügbar. Eine weitere Möglichkeit, diese Banden zu vermeiden, ist die nachträgliche Aufreinigung der zellfrei hergestellten rekombinanten Proteine. Dies ließ sich allerdings aufgrund der geringen Menge von 45 µl Protein nicht realisieren, da es so zu einem zu hohen Verlust an Enzym kam. Aus diesem Grund wurde auf *in vivo* Proteinexpression und die Aufreinigung der so gewonnenen TK-Proteine zurückgegriffen (Kapitel 4.13, S. 48).

Die starke Differenz der Bandenintensität im Western Blot mit nicht aufgereinigten Proteinen lässt sich durch die *in vitro* Proteinsynthese erklären. Es ist denkbar, dass bei einigen Proben eine verminderte Expression des TK-Gens im Vergleich zu der Expression von bakteriellen Proteinen stattfand. Dies kann weiterhin dazu führen, dass die im DiviTum<sup>TM</sup>-Test ausgewertete Verdünnungsstufe nicht immer dieselbe Menge an TK-Protein enthielt. Um falsch negative Ergebnisse durch eine zu niedrig konzentrierte TK zu verhindern, wurden Proteine, deren Aktivität mehr als 0,0 DU/l aber weniger als 10% der WT-Aktivität betrug, als Proteine mit schwach positiver Aktivität klassifiziert (Sauerbrei et al. 2012). Eine andere Ursache für die unterschiedliche Bandenstärke liegt im Bradford-Assay. Dieser differenziert zum einen nicht zwischen TK- und *E. coli*-Proteinen. Zum anderen führen schon kleine Abweichungen beim Erstellen der BSA-Standardreihe oder der Verdünnung der Proben zu größeren Abweichungen bei den kalkulierten Proteinkonzentrationen. Im Gegensatz hierzu zeigte sich beim Einsatz *in vivo* hergestellter und aufgereinigter Proteine im Western Blot die gleiche Bandenstärke bei allen Proben.

Dennoch erwies sich die SDS-Page mit nachfolgendem Western Blot als geeignete Methode, den Erfolg der Proteinsynthese zu verifizieren. So konnte zwar durch die Stärke der Banden nicht unbedingt auf die Konzentration an TK-Protein rückgeschlossen werden, doch es ließ sich ausschließen, dass negative Ergebnisse im DiviTum<sup>TM</sup>-Test durch ein fehlendes TK-Protein zustande kommen würden. Zudem zeigt sich auch bei Vergleich der Ergebnisse des DiviTum<sup>TM</sup>-Tests mit der Stärke der Banden im Western Blot, dass die Bandenintensität keine Aussage über die Aktivität der TK zulässt.

### ➤ *in vivo* Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine

Da in bislang durchgeführten Arbeiten für den DiviTum<sup>TM</sup>-Test zellfrei hergestellte Proteine verwendet wurden, waren neben der TK immer auch *E. coli*-Proteine in der zu analysierenden Lösung enthalten (Sauerbrei et al. 2012). Auch in dieser Arbeit war der Test primär mit nicht aufgereinigten Proteinen erfolgt. Somit ist es denkbar, dass die Proteine aus *E. coli* zu falsch positiven Ergebnissen im DiviTum<sup>TM</sup>-Test führten, indem sie selbst Phosphorylierungsaktivität aufwiesen. Um zu zeigen, dass die Resultate des Tests trotz des Vorhandenseins bakterieller Proteinen zuverlässig und spezifisch sind, wurden die rekombinanten Kontrollproteine WT 232 (PK), R216H (RK) sowie die Proteine mit den AS-Substitutionen R32H, N244H und G264V mittels Strep-tag-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Hierfür wurden die jeweiligen rekombinanten Plasmide in BL21(DE3)-*E. coli* transformiert, da diese nach Induktion mittels IPTG zur *in vivo* Proteinexpression fähig sind (Studier und Moffatt 1986).

Die anschließende Coomassie-Färbung aller Aufreinigungsfraktionen des WT 232 konnte zeigen, dass die Proteinsynthese nach Hinzugabe des IPTG begann und alle detektierbaren bakteriellen Proteine in den Waschschritten 1 bis 3 entfernt wurden. Hierbei fällt auf, dass sowohl im Durchlauf als auch in den ersten drei Waschfraktionen Proteine bei 43 kDa enthalten waren. Diese stellen möglicherweise den Anteil der TK dar, der nicht an die Säule binden konnte. Es ist jedoch auch denkbar, dass ein *E. coli*-Protein, das die gleiche Molekülmasse wie die TK aufweist, in diesen Schritten ausgespült wurde. In den Elutionsfraktionen, die Proteine mit einer Molekülmasse von 43 kDa enthielten, waren keine weiteren bakteriellen Proteine detektierbar – jedoch zeigte sich auch hier eine zweite Bande bei ca. 39 kDa. Da Coomassie-Farbstoff Proteine unspezifisch anfärbt, wurden zur Bestätigung, dass die Proteine bei 43 kDa zweifelsfrei die TK darstellen, erfolgreich Western Blots mittels anti-TK-AK durchgeführt. Auch hier zeigten sich keine unerwünschten bakteriellen Proteine, jedoch die bereits diskutierten Isoformen des TK-Proteins. Mit diesen Fraktionen wurde weitergearbeitet, sodass davon auszugehen ist, dass weder beim Bradford-Test noch bei den TK-Funktionsassays bakterielle Proteine die Messungen verfälschten. Zudem konnten falsch negative Ergebnisse in den folgenden Experimenten verhindert werden.

Es war nicht möglich, die Enzyme mit vorzeitigem Stopp-Codon, wie beispielsweise die RK Q250Stopp, bei der Aufreinigung zu berücksichtigen. Der Grund dafür ist die Lokalisation des Strep-tags am C-Terminus des Proteins, welcher durch die Verkürzung nicht wie beim WT-Protein vorhanden ist. Da sich die Aufreinigung mittels His<sub>6</sub>-tag-Affinitätschromato-

graphie als nicht durchführbar erwies, stellt diese Möglichkeit keine Alternative zu der hier angewendeten Methode dar. Es ist bemerkenswert, dass auch in der Literatur bislang keine Aufreinigung der HSV-1-TK mittels His<sub>6</sub>-tag beschrieben worden ist. Dies sind Hinweise dafür, dass das Enzym eine Konformation annimmt, die dazu führt, dass der His<sub>6</sub>-tag im Inneren des Proteins zum Liegen kommt und somit nicht von der Aufreinigungssäule adsorbiert werden kann. Um das Problem der Purifikation verkürzter TK-Proteine zu lösen, wäre es in künftigen Experimenten sinnvoll, den Strep-tag an den N-Terminus der Proteine zu klonieren und anschließend die Aufreinigung durchzuführen. Alternativ könnte eine Methode etabliert werden, bei der die Enzyme über Säulen gereinigt werden, die mit dem natürlichen TK-Substrat dT beschichtet sind.

## 6.2 Messung der Thymidinkinaseaktivität

### ➤ DiviTum<sup>TM</sup>-Test

Der DiviTum<sup>TM</sup>-Test der Firma Biovica diene zur Kalkulierung der Phosphorylierungsaktivität der rekombinanten TK-Proteine. Dieser wurde ursprünglich für die Messung der zellulären TK-Aktivität im Serum von Patienten mit malignen hämatologischen Erkrankungen entwickelt. Aufgrund der erhöhten Mitoserate bei Tumor- im Vergleich zu gesunden Zellen entsteht ein hoher Bedarf an Desoxythymidintriphosphat (dTTP). Um diesen zu decken, ist die TK besonders in der G1- und S-Phase des Zellzyklus hochaktiv und wird in höheren Mengen als gewöhnlich in die Blutbahn abgegeben. Somit kann die Phosphorylierungsaktivität der TK ein wichtiger Marker für die Früherkennung von Tumoren, für die Prognose des Therapieansprechens und das Risiko von Rezidiven sein (Nisman et al. 2010, Bolayirli et al. 2013, Bacovsky et al. 2014, Nisman et al. 2014). Der modifizierte Test wurde bereits in früheren Studien zur Bestimmung der TK-Aktivität von Patientenisolaten des HSV-1 in Hinblick auf eine ACV-Resistenz (Sauerbrei et al. 2013) und für die Bestimmung der Aktivität rekombinanter Proteine, synthetisiert mit dem Qiagen-Proteinsynthesekit (Sauerbrei et al. 2012), eingesetzt.

Bei der erstmaligen Verwendung von Proteinen, die mit dem Bioneer-Kit synthetisiert worden waren, war es in dieser Arbeit aufgrund der höheren TK-Aktivität nötig, das von Sauerbrei et al. (2012) publizierte Vorgehen zu modifizieren. So kam es bei den Verdünnungen, die für Proteine aus dem Qiagen-Kit ausreichend waren, in den meisten Fällen zu einer Überschreitung des Messbereichs. Aus diesem Grund wurde bei Proteinen aus dem Qiagen-Kit die Verdünnungsstufe 1:3200 (Sauerbrei et al. 2012) und bei Proteinen aus dem Bioneer-Kit die Stufe



1:51200 ausgewertet. Der DiviTum<sup>TM</sup>-Test arbeitet mittels ELISA-Technik, wobei 1%iges BrdU als Substrat für die TK dient. Bromdesoxyuridin zeichnet sich durch die gleiche Struktur wie dT aus, jedoch wurde die Methylgruppe am fünften Kohlenstoffatom durch Brom substituiert. Dies hat zur Folge, dass eine Veränderung der Substratspezifität der TK mittels DiviTum<sup>TM</sup>-Test nicht zwangsläufig beurteilt werden kann. Somit besteht die Möglichkeit, dass eine mutierte TK zwar BrdU phosphoryliert, ACV jedoch nicht. Auch der umgekehrte Fall ist denkbar. Dies kann sowohl in falsch positiven als theoretisch auch in falsch negativen Ergebnissen resultieren. Da ACV jedoch im Gegensatz zu dT kein natürliches Substrat der TK darstellt, sind falsch negative Befunde wenig wahrscheinlich. Dies entspricht auch den bisher publizierten Ergebnissen des DiviTum<sup>TM</sup>-Testes (Sauerbrei et al. 2012). Eine weitere Ursache möglicher falsch positiver Ergebnisse ist die Verwendung des zellfrei synthetisierten Proteingemisches, das auch Enzyme aus *E. coli* enthält. Eine signifikante Phosphorylierung von BrdU durch bakterielle Proteine konnte jedoch durch die Mitführung der NK, des Vektors pIX3.0 ohne TK-Gen-Insert, ausgeschlossen werden (Sauerbrei et al. 2013). Bei keiner Messung zeigte die NK Enzymaktivität, was gegen eine Phosphorylierung des BrdU durch Proteine aus *E. coli* spricht. Darüber hinaus wurde der DiviTum<sup>TM</sup>-Test mit den *in vivo* synthetisierten, aufgereinigten Proteinen durchgeführt, wobei vergleichbare Ergebnisse erhalten wurden. Deshalb ist davon auszugehen, dass die im DiviTum<sup>TM</sup>-Test mit nicht aufgereinigten Proteinen erhaltenen Ergebnisse als zuverlässig zu betrachten sind.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Chargen des DiviTum<sup>TM</sup>-Testes verwendet. Die Mitführung mehrerer Kontrollproben verifizierte die Eignung beider Chargen des DiviTum<sup>TM</sup>-Kits für die Testung der Phosphorylierungsaktivität der TK sowohl im Falle von natürlichen Polymorphismen als auch von Resistenzmutationen durch einzelne AS-Substitutionen und verfrühte Stopp-Codons. Darüber hinaus zeigte die zweite, durch den Hersteller verbesserte Charge mit vierfach höherer Enzymaktivität des WT-Proteins aus dem Qiagen-Kit eine höhere Sensitivität als die erste, sodass künftige Testungen mittels dieses Testsystems noch besser zwischen schwach positiver und positiver Aktivität differenzieren können. Dennoch hat auch die Beurteilung einer selten auftretenden Veränderung der Substratspezifität Relevanz, wobei eine solche nicht mittels DiviTum<sup>TM</sup>-Test erfasst werden kann (Bacon et al. 2003, Sauerbrei et al. 2010b). Aus diesem Grund wurden mit HPLC/UV bzw. LC/MS/MS weitere Methoden etabliert, bei der ACV wie im Falle einer Therapie am Patienten als Substrat der rekombinanten TK dient. Vorteile des DiviTum<sup>TM</sup>-Tests sind jedoch seine einfache Durchführbarkeit, die

kommerzielle Verfügbarkeit, der geringe Zeitaufwand sowie die hohe Sensitivität. Darüber hinaus kommt dieser ohne radioaktiv gekoppelte Substanzen aus, auf denen viele andere TK-Funktionsassays basieren.

Die Etablierung der ersten TK-Aktivitätsteste erfolgte unter Verwendung von radioaktivem [ $^3\text{H}$ ]-dT im Jahr 1981. Hier wurde die Phosphorylierungsaktivität der TK eines Vaccinia-Virus gemessen (Hruby und Ball 1981). Grundlage dieser Methode ist die Phosphorylierung des radioaktiv gelabelten dTs durch die TK, welches nach der Reaktion von einer Diethyl-aminoethyl-Cellulose-Membran adsorbiert wird. Anschließend kann die Membran gewaschen und der Gehalt an [ $^3\text{H}$ ]-dTMP mit einem Flüssigszintillationszähler gemessen werden. Dieser Assay wurde später für die TK des HSV (Palu et al. 1989) sowie des VZV (Morfin et al. 1999) adaptiert und wird heutzutage noch immer angewendet (Pan et al. 2014). Eine Einschränkung des Tests besteht allerdings in der Applikation radioaktiv markierter Substanzen. So kann dieser nur in Speziallaboren durchgeführt werden, die für den Umgang mit radioaktiven Chemikalien zugelassen sind. Aus diesem Grund wurden neben dem DiviTum<sup>TM</sup>-Test weitere, vergleichbare Testsysteme entwickelt, um die TK-Aktivität zu bestimmen. Ein Beispiel hierfür ist der ADP-Glo<sup>TM</sup> Kinase-Test, dessen Anwendung zur Aktivitätstestung der herpesviralen TK erstmals im Jahr 2012 beschrieben wurde (Burrell et al. 2012). Dieser basiert auf der Umwandlung von ATP in ADP bei der Phosphorylierung von ACV. Das neu gebildete ADP wird im nächsten Schritt durch ein im Kit enthaltenes Reaktionsgemisch wieder in ATP umgewandelt, um anschließend durch eine Luciferase/Luciferin-Reaktion quantifiziert zu werden (Promega 2014). Vorteil dieses Tests ist die Verwendung von ACV als TK-Substrat. So ist es möglich, eine veränderte Substratspezifität der TK zu detektieren. Allerdings zeigte auch die mitgeführte NK schwache Aktivität, sodass eventuell nicht alle TK-Mutanten erkannt werden können. Dies prädestiniert die Methode eher zur Erkennung von reduzierten TK-Aktivitäten als zur Detektion von Resistenzen (Burrell et al. 2012), wohingegen der in dieser Studie verwendete und modifizierte DiviTum<sup>TM</sup>-Test sowohl Resistenzmutationen als auch natürliche Polymorphismen charakterisieren kann (Sauerbrei et al. 2012).

### ➤ Hochleistungsflüssigkeitschromatographie/UV-Spektrometrie

Eine weitere Möglichkeit, die Enzymaktivität der TK zu bestimmen, ist die Messung des Gehalts an ACV-MP, nachdem die TK mit ACV inkubiert wurde. Dies kann beispielsweise mittels HPLC/Diodenarraydetektor (DAD) geschehen, wie Malartre et al. (2012) anhand von acht

TK-Mutanten zeigte. Auch dieses Verfahren erlaubt die Detektion einer veränderten Substratspezifität der TK, indem dT zusätzlich zu ACV als Substrat eingesetzt wird. Eine vergleichbare Methode konnte im Rahmen dieser Arbeit mittels HPLC/UV entwickelt werden, um zweifelhafte Resultate des DiviTum<sup>TM</sup>-Tests zu überprüfen. Dies gilt insbesondere für schwach positive Phosphorylierungsaktivitäten oder für widersprüchliche Ergebnisse im Vergleich zum Phänotyp. Um die Eignung der Methode zu prüfen, wurden exemplarisch die aufgereinigten Proteine WT 232 (PK) und R216H (zRK) in einem Phosphorylierungspuffer mit ACV bzw. dT und ATP (Tab. 4, S. 32) inkubiert. In diesem Fall war es nicht nötig, die NK aus dem Vektor pIX3.0 ohne TK-Gen-Insert mitzuführen, da durch die Aufreinigung die bakteriellen Proteine entfernt worden waren und die Proben ausschließlich aus dem gewünschten Enzym bestanden. Zwar ist die Herstellung aufgereinigter Proteine als Voraussetzung für die Anwendung von HPLC/UV sehr zeitaufwändig, doch können hierdurch falsch positive Ergebnisse sicher ausgeschlossen werden.

Mittels HPLC/UV wurde der Gehalt an ACV und ACV-MP oder dT und dTMP sowie ATP und ADP nach der Inkubation in Dreifachmessungen bestimmt. Durch Vergleich mit dem entsprechenden Standard konnten in den so erhaltenen Chromatogrammen die Peaks, die die jeweiligen Analyten darstellten, zweifelsfrei identifiziert werden. Es zeigte sich, dass in den Proben mit der WT-TK sowohl ACV/dT und ATP als auch ACV-MP/dTMP und ADP enthalten waren. Da nur 0,12 mM ACV im Vergleich zu 1,88 mM ACV-MP bzw. 0,29 mM dT im Vergleich zu 1,71 mM dTMP detektiert und damit ACV fast vollständig zu dTMP-MP umgesetzt wurde, konnte darauf geschlossen werden, dass der Phosphorylierungspuffer adäquat für die Induktion der Aktivität der rekombinanten Proteine war. Bei Inkubation der RK R216H mit ACV und ATP zeigte sich anschließend durch die fehlende TK-Aktivität keinerlei ACV-MP, ADP oder dTMP. Diese Ergebnisse verdeutlichen die Eignung der HPLC/UV zur Detektion von ACV, ACV-MP, dT, dTMP, ATP und ADP. Zudem validiert die sehr geringe Standardabweichung von maximal 0,11% zwischen den einzelnen Messungen diese Methode als äußerst zuverlässig. Aus diesem Grund wurden zusätzlich zu den Kontrollen jeweils eine mittels DiviTum<sup>TM</sup>-Test als natürlicher Polymorphismus, eine als Polymorphismus mit schwacher Phosphorylierungsaktivität und eine als Resistenzmutante charakterisierte AS-Substitution weiterführend getestet.

Darüber hinaus erlaubt dieses Verfahren eine näherungsweise Bestimmung des  $k_{cat}$  sowohl für die Umsetzung von ACV und dT als auch von ATP. Dies ist eine zusätzliche Möglichkeit,

Messfehler auszuschließen, da sich die Werte in etwa entsprechen müssten. Es zeigen sich jedoch Abweichungen der Werte von maximal 0,009/s. Dies ist auf die Berechnung des  $k_{cat}$  zurückzuführen, bei der davon ausgegangen wird, dass die Enzymkinetik linear wäre. Realistisch ist jedoch ein etwa logarithmischer Anstieg der Enzymaktivität bis zur Sättigung aller Enzyme mit Substrat. Ab diesem Zeitpunkt bleibt der Umsatz konstant (Frobert et al. 2005). Die genauen Werte lassen sich jedoch mittels der in dieser Arbeit verwendeten Methoden nicht bestimmen. Für diesen Zweck ist die Durchführung enzymkinetischer Untersuchungen nötig, die auf dem Einsatz radioaktiv gekoppelter Substanzen basieren (Gerber und Folkers 1996, Morfin et al. 1999).

Der entscheidende Vorteil dieser Methode gegenüber dem DiviTum<sup>TM</sup>-Assay besteht in der Möglichkeit, zwischen TK<sup>-</sup>, TK<sup>R</sup>- und TK<sup>A</sup>-Mutanten zu differenzieren (Malartre et al. 2012): TK<sup>-</sup>-Proteine (fehlende TK-Aktivität) zeigten hierbei weder gegenüber ACV noch gegenüber dT eine Phosphorylierungsaktivität. Im Falle von TK<sup>R</sup>-Proteinen (reduzierte TK-Aktivität) fand zwar eine Phosphorylierung von ACV und dT statt, diese war jedoch nur relativ schwach ausgeprägt. TK<sup>A</sup>-Mutanten (alterierende Substratspezifität) sind gekennzeichnet durch Phosphorylierung von dT, während gegenüber ACV keine Aktivität zu detektieren war. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass es TK<sup>-</sup>-Mutanten bis auf wenige Ausnahmen (Sasadeusz und Sacks 1996, Swetter et al. 1998, Morfin et al. 2000b) nicht möglich ist, latente Infektionen zu etablieren, die reaktivierbar sind (Field und Wildy 1978, Bacon et al. 2003). Im Gegensatz dazu haben TK<sup>R</sup>-Mutanten gegenüber dem WT oftmals nur einen geringen Teil ihrer Virulenz eingebüßt. So sind diese noch in der Lage, zu rekurrierenden Infektionen zu führen, was eine medikamentöse Prophylaxe erfordern würde (Coen 1994, Hwang et al. 1994). Relativ selten auftretende TK<sup>A</sup>-Mutanten weisen zwar oftmals Resistenzen gegen Nukleosidanaloga wie ACV auf, können aber trotzdem sensitiv gegenüber PCV sein (Bacon et al. 2003, Sauerbrei et al. 2010b). Hieraus ergibt sich eine therapeutische Konsequenz, so dass die Möglichkeit der Differenzierung zwischen TK<sup>-</sup>, TK<sup>R</sup> und TK<sup>A</sup> mittels HPLC/UV relevant ist, um Patienten mit resistenten HSV-1-Stämmen adäquat behandeln zu können.

### ➤ Flüssigchromatographie/Massenspektrometrie

Ziel dieser Arbeit war es, einen weiteren funktionellen TK-Assay auf Basis der LC/MS/MS zu erarbeiten. Als Grundlage für die Entwicklung dieser Methode diente eine Publikation von van Velzen et al. aus dem Jahr 2012, bei der Matrix-assistierte Laser-Desorption/Ionisation

(MALDI) zur Ionisierung von ACV und ACV-MP vor der Detektion der Analyten mittels MS/MS angewendet wurde. Diese Arbeitsgruppe verwendete in einer Fibroblastenzelllinie exprimierte, rekombinante TK-Proteine. Diese wurden jedoch, anders als in der hier vorliegenden Arbeit, nicht aufgereinigt. Stattdessen wurde die Konzentration an TK im Proteingemisch mittels Durchflusszytometrie bestimmt, sodass die Menge der einzusetzenden Proteine berechnet werden konnte. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass Aciclovir nicht nur durch die virale TK, sondern auch durch zelluläre Proteine phosphoryliert worden war, sodass ebenso wie beim DiviTum<sup>TM</sup>-Test schwach positive Aktivitäten weiterführend getestet werden müssten.

Um diese Fehlerquelle bei der Analyse zu vermeiden, wurden in der vorliegenden Arbeit, wie schon bei der Anwendung von HPLC/UV, *in vivo* exprimierte, aufgereinigte TK-Proteine für die Analyse mittels LC/MS/MS verwendet. Exemplarisch inkubierten die Kontrollproben WT 232 (PK) und R216H (zRK) in Phosphorylierungspuffer. Anschließend erfolgte die Messung der Konzentration an ACV und ACV-MP nach ESI mittels LC/MS/MS. Hierbei wurden die Analyten fragmentiert und nach ihrem  $m/z$  aufgetrennt, wobei die zur Detektion verwendbaren Fragmente zuvor durch sogenannte Fragmentprofile festgelegt worden waren. Nur in dem Spektrum, das nach Inkubation des WT 232 erhalten wurde, konnte ACV-MP gemessen werden. In der Probe der zRK R216H war kein ACV-MP zu detektieren. Bei Betrachtung der erhaltenen Spektren zeigte sich eine hohe Hintergrundaktivität. Diese ist vermutlich auf Messunregelmäßigkeiten und Salze in den verwendeten Puffern zurückzuführen, da ESI als Ionisationsmethode relativ empfindlich gegenüber Salzen ist (Hesse et al. 2012). Darüber hinaus ist in allen Proben, die positiv ionisiert wurden, ein hoher Peak bei etwa 3,2 min zu erkennen, der auch den Peak bei der Detektion von ACV übertrifft. Dieser zeigt möglicherweise die ebenfalls positiv ionisierte TK, da diese rechnerisch bei einer Ladung von 190 C ein  $m/z$  von 225,1, vergleichbar dem  $m/z$  von ACV bei einfacher Ionisierung, hätte. Es ist denkbar, dass auch bei der Fragmentierung des Proteins in der zweiten Kammer des Massenspektrometers Fragmente mit einem  $m/z$  von 152,1 entstehen, sodass das Vorhandensein des Proteins im Spektrum sichtbar wird. Dieser Sachverhalt verdeutlicht die Relevanz der Mitführung eines geeigneten Standards in jedem Lauf.

Bei Wiederholung der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche zeigten sich jedoch inkonsistente Ergebnisse. So war es selbst bei Messung der selben Probe nicht möglich, vergleichbare Werte für die Konzentration an ACV und ACV-MP zu erhalten. Es ist auszuschließen, dass

die rekombinanten TK-Proteine selbst oder der Phosphorylierungspuffer die Ursache für diese Probleme sind, da dieselben Proben mittels HPLC/UV analysiert worden waren, wobei sich die Ergebnisse reproduzieren ließen. Dennoch gibt es mehrere mögliche Gründe für die stark variierenden Resultate bei LC/MS/MS: Zum einen könnte die LC-Säule, die die Analyten nach ihrer Hydrophobizität auftrennt, nicht sensitiv genug für die relativ hydrophilen Analyten ACV und ACV-MP sein, die sich beide sehr früh von der Säule lösten. Leider geben van Velzen et al. (2012, 2013) nicht an, welche Art von Säule verwendet wurde, sodass an diesen Untersuchungen keine Orientierung möglich war. Im Vergleich mit der ebenfalls in dieser Arbeit implementierten Methode zur TK-Aktivitätstestung mittels HPLC/UV ist festzustellen, dass die hier verwendete Anionenaustauschersäule besser zur Trennung von ACV und ACV-MP geeignet ist.

Eine weitere Ursache für die schlechte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist möglicherweise die Art der Ionisierung. Während sowohl in der hier vorliegenden Arbeit als auch von van Velzen et al. (2012) ein Triple-Quadrupol-Tandemmassenspektrometer genutzt wurde, unterscheidet sich die Art der Ionisation: Bei MALDI (van Velzen et al. 2012) werden die Analyten auf der Oberfläche eines metallischen Trägers getrocknet und mit UV-Laserimpulsen bestrahlt, sodass durch Absorption Ionen entstehen. Im Gegensatz dazu bildet ESI, wie in dieser Arbeit verwendet, Ionen durch die Überführung geladener Teilchen auf den in Wasser oder Ethanol gelösten Analyten. Wenn das Lösungsmittel verdampft, übersteigt die Abstoßung dieser Ladungen die Oberflächenspannung der Tröpfchen, in denen die Analyten enthalten sind (Raleigh-Effekt), sodass ein Spray entsteht (Hesse et al. 2012). Beide Techniken sind sehr modern und werden als „sanfte Ionisierungsmethoden“ bezeichnet, jedoch haben sich in vergleichend durchgeführten Arbeiten komplementäre Ergebnisse gezeigt. So konnten bei der Ionisation derselben Probe einige Stoffe besser mit MALDI, andere besser mit ESI detektiert werden (Thieu-Simchen 2007). Dies ist womöglich auch bei ACV und ACV-MP der Fall. In ebendieser Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass MALDI weniger empfindlich gegenüber Salzen und anderen störenden Substanzen im Puffer reagiert als ESI. Das zur Phosphorylierung von ACV durch die TK essentielle  $MgCl_2$  könnte somit die Messung behindert haben (Hesse et al. 2012, Thieu-Simchen 2007). Darüber hinaus muss bedacht werden, dass ACV schlecht löslich in Wasser, Ethanol und Methanol ist (American Society of Health-System Pharmacists 1999, Royal Pharmaceutical Society of Great Britain 1999). Während MALDI auf getrocknete Analyten zurückgreift, müssen die zu detektierenden Substanzen bei

ESI gelöst werden (Hesse et al. 2012). Auch aus diesem Grund ist MALDI als Ionisierungsmethode gegenüber ESI bei der Detektion von ACV und ACV-MP zu bevorzugen. Aufgrund dieser Probleme bei der Detektion von ACV und ACV-MP mittels LC/MS/MS konnte keine Standardreihe gemessen werden. Somit war eine Berechnung der Konzentrationen der Analyten nicht möglich.

➤ **Vergleichende Bewertung der funktionellen Thymindinkinase-Aktivitätsassays**

Die Ergebnisse, die in dieser Arbeit erzielt wurden, zeigen, dass LC/MS/MS nach ESI nicht zur verlässlichen Testung unklarer oder literaturunbekannter AS-Substitutionen im HSV-1-TK-Gen geeignet ist, da keine reproduzierbaren Resultate erhalten werden können. Im Gegensatz dazu zeigt sich eindeutig, dass sowohl der DiviTum<sup>TM</sup>-Test als auch die Detektion von ACV und ACV-MP mittels HPLC/UV sehr zuverlässige Methoden zur Charakterisierung solcher Austausche darstellen. Der modifizierte DiviTum<sup>TM</sup>-Assay ist einfach und schnell durchzuführen und wird kommerziell vertrieben. Da er jedoch zur Tumordiagnostik vorgesehen ist, muss er für die Prüfung der HSV-spezifischen TK modifiziert werden. Die benötigten Reagenzien und Puffer für HPLC/UV sind zwar preisgünstig auf kommerziellem Wege erhältlich, jedoch ist die erforderliche Aufreinigung rekombinanter Proteine eine aufwändige und langwierige Aufgabe. Bei Betrachtung der Ergebnisse wird deutlich, dass die mittels HPLC/UV erhaltenen Resultate eine höhere Aussagekraft als die des DiviTum<sup>TM</sup>-Testes besitzen. So kann genau berechnet werden, welcher Anteil von ACV zu ACV-MP pro TK-Molekül umgesetzt worden ist. Die mittels DiviTum<sup>TM</sup>-Assay erhaltenen Absolutwerte lassen sich nicht in gleichem Maße auswerten, da weder ACV als Substrat der TK dient noch klar ist, wie hoch der Anteil des gewünschten Proteins am eingesetzten Proteingemisch ist. Dem könnte jedoch Abhilfe geschafft werden, indem die TK-Proteine mittels Durchflusszytometrie quantifiziert (van Velzen et al. 2012) oder aufgereinigte Proteine eingesetzt werden. Dennoch sind die mittels DiviTum<sup>TM</sup>-Test erhaltenen Ergebnisse bei Abgleich mit den Ergebnissen eines WT-Proteins und Mitführung einer NK sowie mehrerer PK und RK unter Berücksichtigung des relativ geringen methodischen Aufwandes als aussagekräftig zu bewerten. Darüber hinaus ist bemerkenswert, dass die neue, vom Hersteller verbesserte Charge des DiviTum<sup>TM</sup>-Testes im Vergleich zur vorherigen als wesentlich sensitiver einzuschätzen ist.

Aus den hier aufgeführten Gründen bietet es sich an, den modifizierten DiviTum<sup>TM</sup>-Assay als Standardmethode zur routinemäßigen Abklärung unklarer oder unbekannter AS-Substitu-

tionen im TK-Gen des HSV-1 einzusetzen. Proteine, die in diesem Test eine schwach positive Aktivität oder widersprüchliche Ergebnisse im Vergleich zum Phänotyp zeigen, sollten künftig mittels HPLC/UV weiterführend überprüft werden. Die Methode ist zwar zeitaufwändig, jedoch auch als äußerst zuverlässig anzusehen. Störende Komponenten zusätzlicher bakterieller Proteine sowie der Einsatz von BrdU entfallen. Der entscheidende Vorteil ist, dass mit dem Einsetzen von ACV und dT als TK-Substrate die zuverlässige Differenzierung zwischen TK<sup>-</sup>, TK<sup>R</sup>- und TK<sup>A</sup>-Mutanten gelingt.

An dieser Stelle ist jedoch anzumerken, dass in der Vergangenheit verschiedene TK-Aktivitätsassays zu widersprüchlichen Resultaten geführt haben. So wurde der AS-Austausch R41H mittels DiviTum<sup>TM</sup>-Test als natürlicher Polymorphismus klassifiziert (Sauerbrei et al. 2012), was aktuell mittels Herstellung und phänotypischer Testung rekombinanter, replikationsfähiger Viren bestätigt werden konnte (Brunnemann et al. 2016). Mittels LC/MS/MS wurde dieser Austausch jedoch als Resistenz-assoziiert eingestuft (van Velzen et al. 2013). Dies ist ein weiterer Beleg dafür, dass eine Methode auf der Grundlage der MS nicht zur verlässlichen Charakterisierung von AS-Substitutionen im HSV-1-TK-Gen geeignet ist. Es ist aus diesem Grund notwendig, nicht nur einen, sondern mehrere Methoden zur Prüfung unklarer Austausche einsetzen zu können. Als weitere Alternative bietet sich der Einsatz rekombinanter HSV-1 an, da die so erhaltenen Ergebnisse nicht nur isolierte Proteine betrachten, sondern den Einfluss von AS-Substitutionen auf die Replikation kompletter Herpesviren widerspiegeln (Bestman-Smith und Boivin 2003, Piret et al. 2015, Brunnemann et al. 2016).

### 6.3 Interpretation der Ergebnisse

Die durchgeführten Experimente ermöglichten die Abklärung unklarer und literaturunbekannter AS-Veränderungen hinsichtlich ihrer Bedeutung für eine Resistenz insbesondere gegenüber ACV. Durch die Mitführung mehrerer Kontrollen konnten die erhaltenen Ergebnisse abgesichert werden. Bei Einsatz der Proteine aus dem Bioneer-Kit mussten im DiviTum<sup>TM</sup>-Test zusätzliche Verdünnungsstufen angelegt werden. Da zudem DiviTum<sup>TM</sup>-Testkits aus zwei Chargen verwendet wurden, musste dies ebenfalls bei der Berechnung der Cut-off-Werte berücksichtigt werden. Einige dieser Ergebnisse wurden mittels HPLC/UV bestätigt bzw. im Falle schwach positiver Aktivitäten näher charakterisiert.



### ➤ Kontrollproben

Zur Interpretation der Ergebnisse dienten Kontrollproben, die bei allen Versuchen mitgeführt wurden. Die bekanntermaßen ACV-sensitive PK, **WT 232** (Bohn et al. 2011, Sauerbrei et al. 2012), zeigte in jedem Testdurchlauf eine positive Enzymaktivität. Die höchste Aktivität wurde nach Synthese mittels Bioneer-Kit unter Verwendung von DiviTum<sup>TM</sup>-Kits der zweiten Charge erreicht. Basierend auf diesen Ergebnissen konnten Cut-off-Werte für positive TK-Aktivitäten berechnet werden. Abhängig vom verwendeten Proteinsynthesekit bzw. von der Charge des DiviTum<sup>TM</sup>-Tests lagen diese bei 121,4 DU/l (Qiagen-Kit, erste Charge DiviTum<sup>TM</sup>), 531,7 DU/l (Qiagen-Kit, zweite Charge DiviTum<sup>TM</sup>) bzw. 3215,5 DU/l (Bioneer-Kit, zweite Charge DiviTum<sup>TM</sup>). Als NK diente das Protein aus dem Vektor **pIX3.0** ohne TK-Gen-Insert. Folglich konnte hier kein TK-Protein synthetisiert werden, sodass die Enzymaktivität der NK in der auszuwertenden Verdünnungsstufe immer bei 0,0 DU/l lag. So ergibt sich aus den Ergebnissen der NK ein Cut-off für fehlende Enzymaktivität von 0,0 DU/l für beide Proteinsynthesekits sowie Chargen des DiviTum<sup>TM</sup>-Testsystems. Lag die Aktivität von TK-Proteinen zwischen den Cut-off-Werten für positive bzw. negative Aktivität, wurde diese als schwach positiv eingeschätzt. Weiterhin diente ein auf 250 AS verkürztes und damit nicht funktionsfähiges TK-Protein als RK (**Q250Stopp**). Dieses zeigte durchweg keine Phosphorylierungsaktivität in der Verdünnungsstufe, die für die Einteilung der TK-Aktivität entscheidend war. Daher konnte die Resistenzassoziation des Proteins Q250Stopp zweifelsfrei bestätigt werden. Diese Kontrollproben waren bereits zuvor auf ihre Eignung geprüft und publiziert worden (Sauerbrei et al. 2011, Sauerbrei et al. 2012).

Die zPK mit der AS-Substitution **A156P** war durch phänotypische Testung als natürlicher Polymorphismus eingestuft worden (Schmidt et al. 2015). Das rekombinante Protein mit diesem Austausch zeigte auch im DiviTum<sup>TM</sup>-Test deutlich über der WT-Aktivität liegende Werte. Die Lokalisation der Substitution in einer nicht konservierten Genregion spricht zusätzlich für dieses Ergebnis. Zudem besitzen beide beteiligte AS eine sehr kleine Größe und eine nicht reaktive Seitenkette, sodass sie selten in aktive Regionen eingebunden sind. Dies deutet auch darauf hin, dass die Substitution von Alanin (Ala, A) durch Prolin (Pro, P) keine gravierenden Konsequenzen für die Proteinfunktion aufweist, da Ala156 selbst vermutlich keinen Einfluss auf die Funktionalität des Enzyms hat (Betts und Russell 2003). Auch die zPK **P268M** wurde durch Abgleich von Phäno- und Genotyp als dem natürlichen Polymorphismus der HSV-1-TK zugehörig erkannt (Schmidt et al. 2015). Diese Substitution liegt ebenfalls außerhalb akti-

ver oder konservierter Regionen. Prolin stellt eine Besonderheit dar, da es als einzige AS eine sekundäre  $\alpha$ -Aminogruppe besitzt, die über einen Pyrrolidin-Heterocyclus mit dem Rückgrat verbunden ist. Somit sind sowohl Seitenkette als auch Proteinrückgrat konformationell sehr unflexibel. Darüber hinaus ist die Seitenkette des Pro chemisch eher wenig reaktiv, sodass sie selten in relevante Proteinfunktionen involviert ist. Ähnlich verhält es sich mit Methionin (Met, M). Durch die Bindung einer Methylgruppe an das Schwefelatom der Seitenkette ist diese AS relativ unreaktiv. Zudem führt die lange Seitenkette dazu, dass viele Konformationen nicht eingenommen werden können (Betts und Russell 2003, Müller-Esterl 2011). Diese ähnlichen Eigenschaften machen die Rolle der Substitution zPK P268M trotz des Größenunterschiedes der betroffenen AS als natürlichen Polymorphismus plausibel. Entsprechend zeigte sich für das zugehörige Protein im DiviTum<sup>TM</sup>-Test eine eindeutig positive Aktivität.

Als zRK diente die in der NBS liegende AS-Substitution **L170P**, welche bereits mittels phänotypischem (Burrell et al. 2010) und funktionellem TK-Assay (Burrell et al. 2012) als Resistenzmutation getestet worden war. Dies wurde im DiviTum<sup>TM</sup>-Test bestätigt. Leucin (Leu, L) an Codon 170 verursacht durch die C $\beta$ -Verzweigung seiner Seitenkette einen Knick in der  $\alpha$ -Helix, aus der die NBS besteht (Evans et al. 1998, Betts und Russell 2003). Prinzipiell ist dies auch durch Pro möglich, doch Pro ist eine viel kleinere AS als Leu (Betts und Russell 2003). Dies könnte zur Folge haben, dass Pro an dieser Stelle des Proteins nicht groß genug ist, ein Abknicken der Struktur zu bewirken. Auch drei Codons weiter ist es dem Pro173 nicht möglich, einen Knick in die  $\alpha$ -Helix einzuführen (Evans et al. 1998). Folglich käme es durch den Austausch L170P zu einer Strukturveränderung des aktiven Zentrums, sodass das Substrat der TK nicht korrekt gebunden werden kann. Dieser Sachverhalt erklärt die Resistenzentwicklung durch die Substitution L170P. Weiterhin wurde die zRK **S181N** bei den Testungen mittels DiviTum<sup>TM</sup>-Test mitgeführt. Diese hatte sich in einer im Jahr 2008 erschienenen Studie nach phänotypischer Testung des entsprechenden HSV-1-Stammes als Resistenzmutation erwiesen (Duan et al. 2008). Das Ergebnis konnte mittels DiviTum<sup>TM</sup>-Test bestätigt werden, da das Protein aus dem Bioneer-Kit mit dieser Mutation keine Enzymaktivität aufwies. Die AS-Substitution findet zwar nicht in einer konservierten Region statt, jedoch weisen Serin (Ser, S) und Asparagin (Asn, N) einen bedeutenden Größenunterschied auf. Weiterhin ist die Hydroxygruppe von Ser elektronegativer als die Aminogruppe von Asn, was zur Ausbildung stärkerer Wasserstoffbrückenbindungen führt. Somit wird die ursprüngliche Proteinstruktur zum einen durch die Einführung des großen Asn gestört, was zur Verdrängung anderer AS in der

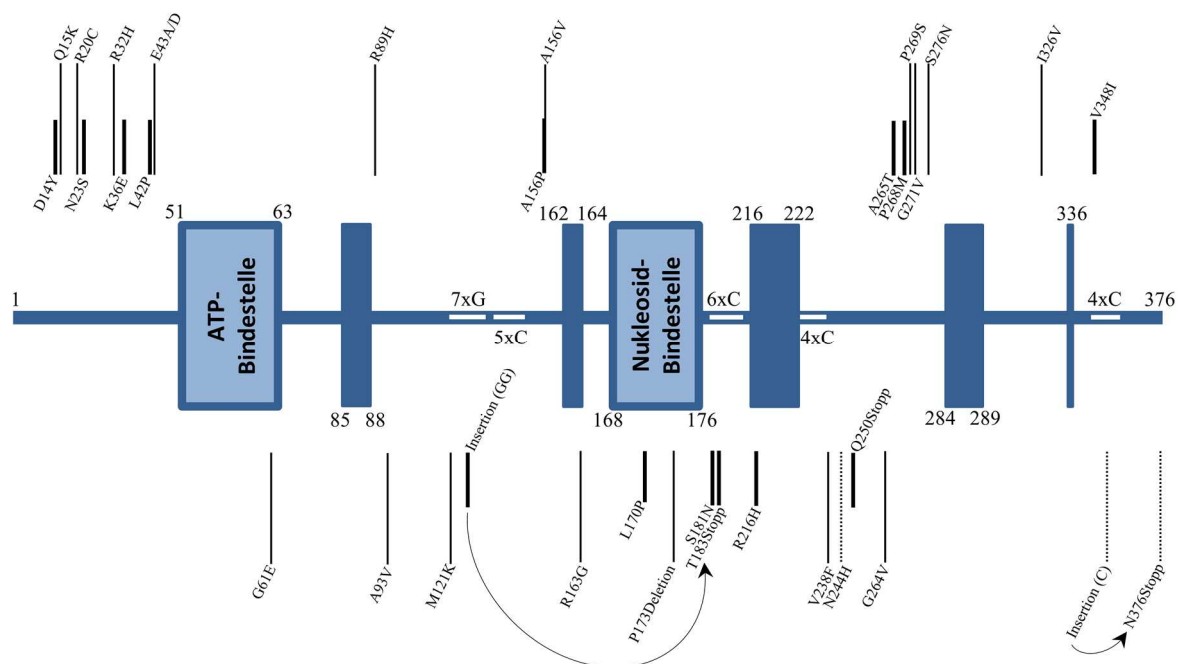
Umgebung führt. Zum anderen entstehen schwächere Wasserstoffbrücken, sodass die korrekte Faltung des Proteins beeinträchtigt werden kann. Dies stellt vermutlich die Gründe für die Resistenzentwicklung durch die Substitution S181N dar. Als dritte zRK diene ein Protein mit der Baseninsertion von zwei Guanin im homopolymeren Bereich zwischen den nt 430 und 438, die zu einem vorzeitigen **Stopp-Codon an AS-Position 183** führt. Das trunkierte Protein zeigte aufgrund seiner Verkürzung im DiviTum<sup>TM</sup>-Test keine Enzymaktivität, was mit den phänotypischen Ergebnissen einer Publikation von Gaudreau et al. (1998) übereinstimmt. Hier war die TK mit dieser Mutation als TK<sup>R</sup> klassifiziert worden. Auch die zRK **R216H** war bereits phänotypisch (Stránská et al. 2004) und funktionell (van Velzen et al. 2013) als Resistenzmutation eingestuft worden. Im DiviTum<sup>TM</sup>-Test konnte wie erwartet keine Enzymaktivität für das Protein detektiert werden. Arginin (Arg, R) an AS-Position 216 liegt in einer konservierten Region des TK-Gens, die ein Cluster von positiven Ladungen ausbildet und mit der ATP-Bindestelle interagiert. So wird der Adenin-Ring des ATP wie von einer Klappe umgeben. Durch den Austausch des positiv geladenen Arg durch das neutrale His geht eine positive Ladung verloren. Folglich kann ATP im aktiven Zentrum der TK nicht korrekt gebunden werden, sodass die Übertragung von Phosphatgruppen durch die TK nicht gewährleistet wird (Evans et al. 1998, Stránská et al. 2004).

Anhand der Mitführung dieser Kontrollen konnte gezeigt werden, dass die TK-Aktivitäten intakter rekombinanter TK-Proteine aus Qiagen- und Bioneer-Kits mit modifizierten DiviTum<sup>TM</sup>-Tests aus beiden Chargen erfolgreich gemessen und reproduziert werden können. Im Gegensatz dazu liefert der Test negative Ergebnisse, wenn kein oder ein defektes Enzym vorliegt. Dies gilt sowohl für Resistenzentstehung durch Einzelbasenaustausche als auch durch Frameshift-Mutationen, die zu einem verfrühten Stopp-Codon führen. In Abb. 54 (S. 114) ist die Lage der als Kontrollen verwendeten Mutationen neben den in dieser Arbeit untersuchten unklaren oder unbekannten AS-Substitutionen in der HSV-1-TK dargestellt.

#### ➤ **Proteine mit unklaren oder unbekannten Substitutionen**

Die Proteine Q15K, R32H, E43A, A93V sowie M121K wurden mittels Qiagen-Kit hergestellt, wobei die Messung der Phosphorylierungsaktivität mittels DiviTum<sup>TM</sup>-Kits der ersten Charge durchgeführt wurde. Zur Einteilung der Phosphorylierungsaktivität dienten folglich die Cut-offs, die aus der Aktivität des WT 232 bzw. der NK aus dem Qiagen-Kit mittels DiviTum<sup>TM</sup>-Testsystemen der ersten Charge ermittelt worden waren. Die Synthese der Protei-

ne R89H und N244H erfolgte ebenfalls mittels Qiagen-Kit, die Testung jedoch durch DiviTum<sup>TM</sup>-Teste der zweiten Charge. Folglich wurden die Cut-off-Werte aus den Aktivitäten der PK bzw. NK aus dem Qiagen-Kit, die durch DiviTum<sup>TM</sup>-Tests der zweiten Charge getestet worden waren, zur Einteilung der Phosphorylierungsaktivität verwendet. Die Herstellung der übrigen Proteine R20C, E43D, G61E, A156V, R163G, P173Deletion, V238F, G264V, P269S, G271V, S276N, I326V und N376Stopp wurde mittels Bioneer-Kit durchgeführt, wobei alle durch DiviTum<sup>TM</sup>-Kits der zweiten Charge getestet wurden. Entsprechende Kontrollen wurden für die Berechnung der Cut-offs verwendet. Abbildung 54 zeigt die Lokalisation aller in dieser Arbeit untersuchten Mutationen im TK-Gen von HSV-1.



**Abb. 54: Lage der untersuchten AS-Substitutionen im TK-Protein.**

Polymorphismen sind oberhalb, Resistenzmutationen unterhalb des Proteins abgebildet. Gepunktete Linien zeigen das verkürzte Protein N376Stopp mit schwach positiver Phosphorylierungsaktivität (vermutlich TK<sup>R</sup>) sowie die TK<sup>A</sup>-Mutante N244H an. Die Kontrollproben inklusive der Polymorphismen des WT 232 (D14Y, N23S, K36E, L42P, A265T, V348I) werden durch kurze, dick gedruckte Linien dargestellt.

Das Protein mit der unklaren Mutation **A156V** zeigte eine positive Enzymaktivität. Der HSV-1-Stamm 185-93, der diese Mutation enthält, hatte sich phänotypisch als ACV-, PCV-, BVDU- und FOS-sensitiv erwiesen (Schmidt et al. 2015), sodass die zusätzlich enthaltene unbekannte Mutation in der TK, N277K, ebenfalls als natürlicher Polymorphismus betrachtet wurde. Allerdings war zuvor ein anderer Stamm (3571-09) mit der Substitution A156V als resistent gegen Nukleosidanaloge und A156V als vermutliche Resistenzmutation publiziert

worden (Sauerbrei et al. 2011). Die zweifelsfrei positive Phosphorylierungsaktivität, die das rekombinante Protein mit der AS-Substitution A156V im DiviTum<sup>TM</sup>-Test zeigte, weißt diese jedoch ebenso wie den verwandten AS-Austausch A156P (Schmidt et al. 2015) als natürlichen Polymorphismus aus. Auch die Lage in einer nicht konservierten Region und der Austausch der kleinen AS Ala mit einer chemisch unreaktiven Seitenkette durch die ebenfalls sehr wenig reaktive AS Val spricht dafür, dass diese Substitution keine Resistenz verursacht. In dem von Sauerbrei et al. (2011) publizierten Stamm ist allerdings weder in der TK noch in der DNA-Pol eine andere AS-Substitution vorhanden, die eine potentielle Resistenzmutation darstellt. Möglicherweise wurde die hier nachgewiesene Resistenz durch den Synergismus mehrerer AS-Substitutionen bedingt, die, wenn sie einzeln auftreten, keine Resistenz verursachen. Diese Hypothese sollte in Zukunft durch weitere TK-Funktionsassays oder phänotypische Tests mit rekombinanten Viren abgeklärt werden. Eine andere Erklärung ist das Vorliegen einer Virusmischpopulation. Hierbei kann sich in der Anzucht der Viren für den phänotypischen Test die ACV-resistente Viruspopulation vermehren, während in der PCR zur genotypischen Testung aus Patientenmaterial die ACV-sensitive Population bevorzugt wird. Diese Hypothese könnte mittels Plaque-Isolation der einzelnen Virusstämme vor der phänotypischen Analyse überprüft werden (Sacks et al. 1989).

Im Patientenstamm 164-06 lagen neben der bekannten Resistenzmutation P84L (Malartre et al. 2012) die drei unklaren AS-Substitutionen R89H, R163G und P173Deletion im TK-Gen vor (Sauerbrei et al. 2010a). Phänotypisch hatte sich der Stamm als resistent gegen ACV, PCV und BVDU sowie sensitiv gegenüber CDV und FOS gezeigt. Der AS-Austausch **R89H** war aufgrund seiner Lage in einer nicht konservierten Region bereits von Sauerbrei et al. (2010a) als vermutlich natürlicher Polymorphismus charakterisiert worden. Diese Einschätzung konnte im DiviTum<sup>TM</sup>-Test bestätigt werden, da das Protein mit dieser Substitution eine hohe Enzymaktivität zeigte. Trotz seiner Lage in einer nicht konservierten Region sind die Eigenschaften des Arg89 relevant für die Enzymfunktion, da es die korrekte Interaktion des Glu225 mit dT gewährleistet (Evans et al. 1998). In der hier durchgeführten Arbeit wurde das basische Arg durch das ebenso basische Histidin (His, H) substituiert. Beide AS sind amphiphil (Müller-Esterl 2011). So bleiben die Eigenschaften, die Arg89 aufweist, trotz der Substitution erhalten. Folglich kann das TK-Protein mit dem Polymorphismus R89H seine Funktion weiter erfüllen. Zudem hatten sich die am selben Codon dokumentierten AS-Austausche R89W (Duan et al. 2009) und R89Q (Sauerbrei et al. 2010a) ebenfalls als natürliche Poly-

morphismen erwiesen. An dieser Stelle ist anzumerken, dass je nach gewähltem Referenzstamm der Austausch von Arg zu Glutamin (Gln, Q) oder umgekehrt stattfinden kann (Kudo et al. 1998). Dies unterstützt die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse, da alle von Kudo et al. (1998) einbezogenen Referenzstämme einen ACV-sensitiven Phänotyp besitzen.

Im Stamm 164-04 trat weiterhin die in einer konservierten Region des TK-Gens liegende AS-Substitution **R163G** auf. Arginin an Codon 163 spielt eine wichtige Rolle für die Funktion der TK und wurde als hochkonserviert beschrieben. Bei Substitution durch eine nicht positiv geladene AS kommt es in jedem Fall zu einer Resistenz gegen ACV (Black und Loeb 1993). Der Grund dafür ist, dass Arg163 bei der Katalyse von dT zu dTMP durch seine positive Ladung zuerst mit dem konservierten Asp55 der TK sowie mit der 5'-Hydroxygruppe des Zuckerrests von dT interagiert. Nach der Reaktion zum dTMP bindet es durch Wasserstoffbrücken dessen  $\alpha$ -Phosphatgruppe (Brown et al. 1995, Wild et al. 1997). Ebenso interagiert Arg163 über multiple Wasserstoffbrücken mit ACV, wenn dieses von der TK metabolisiert wird (Champness et al. 1998). Zudem ist Arg163 an der richtigen Positionierung der Seitenkette des Glu83 beteiligt. Dessen Carboxylatgruppe vermittelt ebenfalls wichtige Funktionen bei der Phosphorylierung des dTs bzw. ACV, da es mit der zu übertragenden Phosphatgruppe des ATP interagiert (Evans et al. 1998). Bei einer Substitution des basischen, positiv geladenen Arg an AS-Position 163 durch das neutrale Glycin (Gly, G), dessen Seitenkette aus nur einem Wasserstoffatom besteht und somit nur eine Wasserstoffbrücke ausbilden kann, wird also die enzymatische Funktionalität der TK nicht länger gewährleistet. Weitere Studien verdeutlichen die Relevanz des Arg163, in denen die Mutante R163H einen TK<sup>R</sup>-Phänotyp zeigte (Bae et al. 2006, Malartre et al. 2012). Deshalb vermuteten Sauerbrei et al. (2010a) bereits, dass es sich bei dem Austausch R163G um eine Resistenzmutation handelt. Diese Hypothese konnte in der vorliegenden Untersuchung bestätigt werden, da das entsprechende Protein im DiviTum<sup>TM</sup>-Test keine Enzymaktivität aufwies.

**P173Deletion** liegt ebenfalls an einer essentiellen Stelle des TK-Gens, in der aktiven Region der NBS. Deshalb wurde diese Deletion von Sauerbrei et al. (2010a) als sehr wahrscheinlich Resistenz-assoziiert klassifiziert. Zudem zeigt eine frühere Studie, dass es nicht möglich ist, AS-Austausche am hochkonservierten Pro173 einzuführen, ohne dass es zu einem Funktionsausfall des TK-Proteins kommt (Munir et al. 1992). Prolin an Codon 173 scheint also essentielle Informationen für die Substratbindung zu vermitteln. Die Relevanz der AS an genau dieser Stelle des Genoms wird auch von der Tatsache gestärkt, dass Pro165 im Gegensatz zu

Pro173 durch mehrere AS substituiert werden kann, ohne dass dies einen Einfluss auf die Aktivität der TK hat (Munir et al. 1992). Die Deletion von Pro an AS-Position 173 des TK-Gens führte also zu einem Funktionsverlust des entsprechenden Enzyms, welcher sich im DiviTum<sup>TM</sup>-Test in einer fehlenden Phosphorylierungsaktivität äußerte. So konnte zum einen der hohe Grad an Konserviertheit von Pro173 bestätigt und zum anderen die Substitution P173Deletion als Resistenzmutation klassifiziert werden. Insgesamt können also zusätzlich zu der bekannten Resistenzmutation P84L zwei weitere AS-Substitutionen, R163G und P173Deletion, für die phänotypische ACV-Resistenz des HSV-1-Stammes 164-06 verantwortlich gemacht werden.

Der am Institut für Virologie und Antivirale Therapie des Universitätsklinikum Jena isolierte und bislang nicht publizierte HSV-1-Stamm 275-11 kodiert neben mehreren natürlichen Genpolymorphismen in der TK für die literaturunbekannte AS-Substitution **R20C**. Aufgrund der geringen Viruslast des Patientenmaterials konnte dieser weder angezüchtet werden noch war es möglich, die DNA-Pol zu sequenzieren. Somit konnte ohne funktionellen TK-Assay keine Aussage über die Signifikanz des AS-Austausches R20C bezüglich einer Resistenz getroffen werden. Eine Studie von Burrell et al. (2010) hatte die verwandte AS-Substitution R20S bereits als natürlichen Polymorphismus klassifiziert. Da sich Ser und Cys nur in einer Hydroxy- bzw. Thiolgruppe unterscheiden, liegt die Vermutung nahe, dass auch der AS-Austausch R20C einen natürlichen Polymorphismus darstellt. Das Ergebnis des DiviTum<sup>TM</sup>-Tests konnte diese Vermutung aufgrund einer Phosphorylierungsaktivität des TK-Proteins von mehr als 2,5-facher WT-Aktivität bestätigen. Dieses Ergebnis untermauert auch die Annahme früherer Studien, dass Substitutionen in den ersten 46 AS der TK im Regelfall keine Resistenz bedingen (Halpern und Smiley 1984). Infolge dieser Ergebnisse kann der Stamm 275-11 trotzdem noch nicht endgültig als ACV-sensitiv beurteilt werden, da keine Informationen zu möglichen AS-Substitutionen in der DNA-Pol vorliegen.

Der AS-Austausch **E43D**, der in der TK des HSV-1-Stammes 409-12 (Schubert et al. 2014) enthalten ist, liegt ebenfalls innerhalb der ersten 46 AS der TK. Deshalb wurde für das Protein mit dieser Substitution eine positive Enzymaktivität erwartet. In der Literatur wurde sie bereits als womöglich Polymorphismus-assoziiert bezeichnet (Schubert et al. 2014). Weiterhin konnten in diesem Stamm die bekannte Resistenzmutation und zRK T183Stopp in der TK (Gaudreau et al. 1998) sowie die unklare Mutation E421V in der DNA-Pol detektiert werden, sodass sich das Isolat als phänotypisch ACV-, PCV- und BVDU-resistent erwies. Mittels

DiviTum<sup>TM</sup>-Test wurde für das Protein mit dem AS-Austausch E43D eine eindeutig positive Enzymaktivität kalkuliert. Infolgedessen ist E43D als natürlicher Polymorphismus des TK-Gens zu betrachten. Glutaminsäure (Glu, E) an Codon 43 konnte ohne Konsequenzen für die TK-Aktivität gegen Aspartat (Asp, D) ausgetauscht werden, das über sehr ähnliche Eigenschaften wie Glu verfügt. So unterscheiden sich beide AS nur um eine Methylgruppe und sind aufgrund der endständigen Carboxylatgruppe ihrer Seitenkette negativ geladen. Weiterhin unterstützt die Polymorphismus-Assoziation der verwandten Substitution E43G dieses Ergebnis (van Velzen et al. 2013). Für die Resistenz des Stammes 409-12 ist also die Mutation T183Stopp verantwortlich, wohingegen für E43D keine Resistenzassoziation zu detektieren war. Über die Signifikanz bezüglich einer Resistenz der unklaren Mutation E421V in der DNA-Pol desselben Stammes kann zum jetzigen Zeitpunkt keine Aussage getroffen werden.

Der AS-Austausch **E43A**, der in der TK der bislang nicht publizierten HSV-1-Stämme 459-11 und 01-14 enthalten ist, findet am selben Codon statt. Deshalb und aufgrund der Lage innerhalb der ersten 46 AS wurde für das Protein mit dieser Substitution eine positive Enzymaktivität erwartet. Auf Basis der phänotypischen Resistenzanalyse beider Stämme gegenüber Nukleosidanaloga ließ sich jedoch keine Aussage über die Auswirkung dieses Austausches treffen, da zusätzlich bekannte Resistenzmutationen oder unklare AS-Substitutionen enthalten waren. Dies betrifft beim Stamm 459-11 die Resistenz-assoziierte Mutation M85Stopp (Burrel et al. 2013) in der TK und die unbekannten AS-Substitutionen G191S und P1114H in der DNA-Pol. Beim Stamm 01-14 wurden zusätzlich die unbekannten AS-Austausche Q15K und I326V bzw. die unklare Substitution A93V (Karaba et al. 2012) in der TK detektiert. Wie erwartet zeigte das rekombinante Protein mit der Substitution E43A im DiviTum<sup>TM</sup>-Test eine deutlich positive Phosphorylierungsaktivität, sodass der Austausch dem natürlichen Polymorphismus der HSV-1-TK zugeordnet werden kann. Weder die negative Ladung noch die Polarität des Glu an Codon 43 scheinen eine essentielle Auswirkung auf die Faltung oder Funktion des TK-Proteins zu haben, sodass der Austausch vom großen, negativ geladenen Glu zum kleinen, unreaktiven Ala problemlos stattfinden kann. Für die Resistenz des Stammes 459-11 ist also die Mutation E85Stopp verantwortlich, während nicht klar ist, welche Rolle die zusätzlich nachgewiesenen, bislang unbekannten Substitutionen G191S und P1114H in der DNA-Pol spielen.

Weiterhin musste geklärt werden, welche der unbekannten bzw. unklaren AS-Substitutionen in der TK des Stammes 01-14 die phänotypische ACV-Resistenz verursachen. Deshalb wur-



den auch diese mittels DiviTum<sup>TM</sup>-Test geprüft. Hier erwies sich die Substitution **Q15K** als natürlicher Polymorphismus, da eine positive Enzymaktivität detektiert werden konnte. Glutamin ist eine polare AS, die eine lange Seitenkette mit einem Carbonsäureamid besitzt. So kann Gln über Wasserstoffbrückenbindungen mit anderen AS wechselwirken und die Struktur des Proteins beeinflussen. Lysin (Lys, K) ist ebenso hydrophil und besitzt eine lange Seitenkette, in der eine Aminogruppe vorhanden ist. Diese kann durch ihre positive Ladung mit anderen, negativ geladenen AS Wasserstoffbrücken bilden (Betts und Russell 2003). Diese Ähnlichkeit bei den Bindungsmöglichkeiten und die nahezu gleiche Größe der Seitenketten verdeutlicht, warum die AS-Substitution Q15K keine Auswirkung auf die Proteinfunktion hat. Auch die Lage in einer nicht konservierten Region und in den ersten 46 AS der TK spricht dafür, dass Gln15 keine essentielle Funktion für das TK-Proteins besitzt (Halpern und Smiley 1984). Darüber hinaus stellt auch der AS-Austausch Q15L einen literaturbekannten natürlichen Polymorphismus dar (Wang et al. 2011).

Der Austausch **A93V** wurde nicht nur im bislang nicht publizierten Stamm 01-14, sondern zusätzlich im ACV- und PCV-resistenten HSV-1-Stamm 406-12 (Schubert et al. 2014) detektiert. Hier lag außerdem die unklare Mutation T1121M in der DNA-Pol vor, sodass auf Grundlage dieser Ergebnisse keine Aussage über die Folgen des Austausches A93V zu treffen war. Die Substitution wurde bereits von Karaba et al. (2012) beschrieben. Hier trat der Austausch A93V allerdings auch in einem resistenten Stamm mit mehreren unklaren Mutationen auf, sodass eine mögliche Resistenzassoziation nicht beurteilt werden konnte. Im DiviTum<sup>TM</sup>-Test zeigte das rekombinante Protein mit dem Austausch A93V keine Phosphorylierungsaktivität. Sowohl Ala als auch Val sind unpolare AS, deren Seitenketten keine chemisch besonders reaktiven Gruppen aufweisen, sodass die Stabilität des TK-Proteins durch diese Substitution vermutlich keine Veränderung erfährt. Zudem ist der Austausch außerhalb aktiver oder konservierter Regionen lokalisiert. Allerdings ist Ala eine sehr kleine AS, die beinahe jede mögliche Konformation annehmen kann. Val ist im Gegensatz dazu C $\beta$ -verzweigt und beansprucht somit extrem viel Raum, was zu einer konformationellen Einschränkung führt. So ist es beinahe unmöglich, dass Val in  $\alpha$ -helicalen Strukturen liegt (Betts und Russell 2003). Evans et al. (1998) konnten zeigen, dass die dem Ala93 benachbarten AS 91 und 92 mit dem Gln an Position 185 interagieren. Dies ist essentiell für die Ausbildung des funktionsfähigen TK-Dimers. Wenn nun also die Einführung der großen Seitenkette des Val93 die Konformation der benachbarten AS stört, wird damit möglicherweise die Dimerbildung der TK verhin-

dert. Dies führt zur Ausbildung eines funktionslosen Proteins und erklärt die Rolle der AS-Substitution A93V bei der Entstehung einer ACV-Resistenz. Eine aktuelle Studie (Karamitros et al. 2016) bestätigt das in dieser Arbeit erhaltene Ergebnis: Das Isolat eines klinischen HSV-1-Stammes, der neben der bis dato unklaren AS-Substitution A93V nur natürliche Genpolymorphismen enthielt, zeigte im Plaquereduktionstest einen ACV-resistenten, jedoch PCV-, BVDU- und FOS-sensitiven Phänotyp. Die PCV-Sensitivität bei ACV-Resistenz spricht wiederum für das mögliche Vorliegen einer TK<sup>A</sup>-Mutante (Bacon et al. 2003, Sauerbrei et al. 2010b).

Das TK-Protein mit der letzten unklaren AS-Substitution des Stammes 01-14, **I326V**, zeigte im DiviTum<sup>TM</sup>-Test eine deutlich positive Enzymaktivität. Somit kann diese als natürlicher Polymorphismus klassifiziert werden. Auch die bekannte benachbarte Substitution L327M wurde nicht mit einer Resistenz in Verbindung gebracht (Frobert et al. 2008). Dies lässt vermuten, dass dieser Teil des Proteins nicht für essentielle Enzymfunktionen codiert oder mit aktiven Zentren in Verbindung steht. Die Lage in einer nicht konservierten Region unterstützt diese Hypothese. Isoleucin (Ile, I) und Val unterscheiden sich in nur einer Ethylgruppe und weisen ähnliche Eigenschaften auf. Beide sind am C $\beta$ -Atom verzweigt, weshalb ihre Hauptketten nur schwierig  $\alpha$ -helicale Konformationen annehmen können. Aus diesem Grund wird die Lage in  $\beta$ -Faltblättern bevorzugt. Weiterhin sind sowohl Ile als auch Val hydrophobe AS, die deshalb vor allem im Inneren des Proteins liegen (Betts und Russell 2003). Durch diese Ähnlichkeiten scheint die an Codon 326 durchgeführte Substitution weder die Struktur noch die Eigenschaften des TK-Proteins zu verändern. Auf Basis der erhaltenen Ergebnisse ist also davon auszugehen, dass die Substitution A93V für die phänotypische ACV-Resistenz des HSV-1-Stammes 01-14 verantwortlich ist, da alle anderen Austausche eindeutig als natürliche Polymorphismen charakterisiert wurden.

Im ACV-, PCV- und BVDU-resistenten HSV-1-Stamm 474-11, der bislang nicht publiziert worden war, liegt neben der der literaturunbekannten AS-Substitution A748T in der DNA-Pol und der bereits beschriebenen Resistenzmutation und zRK R216H (Stránská et al. 2004, van Velzen et al. 2013) der ebenfalls bislang unbekannte Austausch **P269S** in der TK vor. Dieser wurde in der vorliegenden Arbeit analysiert. Im DiviTum<sup>TM</sup>-Test konnte eine positive Enzymaktivität detektiert werden. Demzufolge wird die Substitution als natürlicher Polymorphismus klassifiziert. Prolin stellt eine kleine AS dar. Es ist weiterhin durch seine spezielle Struktur unreaktiv und konformationell eingeschränkt, sodass es zumeist auf der Oberfläche

von Proteinen in engen Windungen zu finden ist. Serin hingegen ist durch die Hydroxygruppe in seiner Seitenkette dazu in der Lage, Wasserstoffbrücken zu bilden. Es kann aber aufgrund seiner geringen Größe wie auch Pro gut in helicalen Strukturen des Proteins liegen. Zudem präferiert es weder eine Lage auf der Oberfläche noch in der Innenseite des Proteins, sodass es die Rolle von Pro269 ohne Probleme übernehmen kann (Betts und Russell 2003). Dies und die Lage des Austausches in einer nicht konservierten Region, die vermutlich nicht in essentielle Proteinfunktionen involviert ist, unterstützt die vorliegenden Ergebnisse. Demzufolge trägt die AS-Substitution P269S nicht zu der phänotypischen ACV-Resistenz des HSV-1-Stammes 474-11 bei. Die Rolle der unklaren Mutation A748T in der DNA-Pol bleibt in weiteren Studien zu klären.

In dem klinisch ACV- und phänotypisch ACV-, PCV-, BVDU- und FOS-resistenten HSV-1-Stamm 202-12 ist die hier untersuchte AS-Substitution **G271V** in der TK enthalten. Zudem konnten die Resistenzmutation G481S und der unklare Austausch I182V in der DNA-Pol detektiert werden (Schubert et al. 2014). Deshalb kann auf Grundlage der phänotypischen Testergebnisse keine Aussage über die Rolle der Substitution G271V bei der Resistenzentstehung getroffen werden. Aufgrund ihrer Lage in einer nicht konservierten Genregion wurde sie in der Literatur als möglicher Polymorphismus bezeichnet (Schubert et al. 2014). Diese Vermutung kann auf Basis der Ergebnisse des DiviTum<sup>TM</sup>-Tests bestätigt werden. Es zeigte sich keine Phosphorylierungsaktivität des entsprechenden rekombinanten TK-Proteins. Bei der AS Gly handelt es sich um die kleinste AS, deren Seitenkette nur aus einem Wasserstoffatom besteht. Dies führt dazu, dass Gly viel Flexibilität in der Konformation aufweist. Somit kann es verschiedene und einzigartige Rollen für die Proteinfunktion übernehmen, wie z.B. die Bindung einer Phosphatgruppe des ATP. Valin hingegen ist eine hydrophobe AS, die demzufolge bevorzugt im Kern des Proteins liegt. Im Gegensatz zu Gly ist Val sehr eingeschränkt in den Konformationen, die es einnehmen kann, da es an seinem C $\beta$ -Atom zwei funktionelle Gruppen gebunden hat. Aus diesem Grund liegt Val bevorzugt in  $\beta$ -Faltblättern, während es für  $\alpha$ -Helices zu viel Platz einnimmt. Darüber hinaus ist seine Seitenkette sehr unreaktiv, weshalb Val selten direkt an Proteinfunktionen beteiligt ist (Betts und Russell 2003). Die hier erzielten Ergebnisse für die AS-Substitution G271V führen zu der Annahme, dass Gly271 trotz der vielen Bindungsmöglichkeiten, die es theoretisch hat, keinen Einfluss auf relevante Proteinfunktionen ausübt. Vermutlich liegt die TK im Bereich des Codons 271 als  $\beta$ -Faltblatt

vor, da die Einführung von Val sonst eine bedeutende Konformationsänderung hervorgerufen hätte.

Im HSV-1-Stamm 207-12 liegt die unklare Substitution **G264V** in der TK vor. Dieser Stamm wurde von Schubert et al. (2014) als klinisch ACV- und phänotypisch ACV- und PCV-resistent publiziert. Er beinhaltet zudem die bekannte Resistenzmutation N815S (Matthews et al. 1989) in der DNA-Pol. Durch den DiviTum<sup>TM</sup>-Test konnte G264V ebenfalls als Resistenz-assoziierte Mutation klassifiziert werden, da das rekombinante Protein mit diesem Austausch keine Enzymaktivität zeigte. Dieser Austausch wurde mittels HPLC/UV weiterführend überprüft, da das Vorliegen einer TK<sup>-</sup>, TK<sup>R</sup>- oder TK<sup>A</sup>-Mutante abgeklärt werden sollte. Die Testung mittels HPLC/UV bestätigte das Ergebnis des DiviTum<sup>TM</sup>-Assays: Es konnte nach Inkubation des aufgereinigten Proteins weder ADP noch ACV-MP oder dTMP detektiert werden, sodass von einer TK<sup>-</sup>-Mutante ausgegangen werden kann. Auch die Wiederholung des DiviTum<sup>TM</sup>-Testes mit den aufgereinigten Proteinen bekräftigte die Rolle der AS-Substitution G264V als Resistenzmutation. Wie auch beim natürlichen Genpolymorphismus G271V liegt ein Austausch von Gly zu Val in einer nicht konservierten Region vor. Dennoch erwies sich G264V im Gegensatz zu G271V als Resistenzmutation. Gly kann aufgrund seiner geringen Größe auch in Proteinstrukturen wie  $\alpha$ -Helices liegen, bei denen größere, C $\beta$ -verzweigte AS wie Val die korrekte Faltung verhindern würden. Zudem bewies eine Studie aus dem Jahr 1998 (Evans et al. 1998), dass auch weit vom katalytischen Zentrum entfernte Proteinbereiche durch sogenannte Kontaktregionen mit diesem verbunden sein können. Sie bestehen aus helicalen Segmenten, die durch van der Waals-Kräfte interagieren und von einem Loop eingegrenzt werden (Graham et al. 1968, Balasubramaniam et al. 1998, Saijo et al. 2008). So wird die Anpassung des gesamten Enzyms an verschiedene Substrate gewährleistet. Leider konnte in der von Evans et al. (1998) durchgeführten Studie für die AS 262 bis 279 kein konkretes Ergebnis bezüglich einer Verbindung zum aktiven Zentrum erlangt werden. So kann nur vermutet werden, dass Gly264 in einer solchen Kontaktregion liegt, sodass durch den Austausch G264V eine Änderung der Konformation und damit der Funktion einer Substratbindestelle der TK entsteht.

Die AS-Substitution **R32H** trat in der TK des HSV-1-Stammes 215-12 neben dem unklaren AS-Austausch D672N in der DNA-Pol auf. Klinisch zeigte dieser phänotypisch eine ACV-, PCV- und BVDU-Resistenz (Schubert et al. 2014). In früheren Studien war die verwandte Substitution R32C bereits als natürlicher Polymorphismus identifiziert worden (Frobert et al.

2008), sodass die Vermutung nahelag, dass auch R32H keine ACV-Resistenz hervorruft. Diese Einschätzung konnte mittels DiviTum<sup>TM</sup>-Test bestätigt werden, da eine zweifelsfrei positive Phosphorylierungsaktivität gemessen wurde. Arginin liegt wegen seiner Polarität bevorzugt auf der Oberfläche, ein Teil der Seitenkette ragt jedoch in der Regel in das Innere eines Proteins. Wegen seiner positiven Ladung bildet es Wasserstoffbrücken mit anderen AS, die relevant für die Proteinstruktur sind (Betts und Russell 2003). Histidin kann aufgrund seines pK<sub>a</sub>-Wertes, der nahe am physiologischen pH-Wert liegt, relativ leicht Protonen an seine Seitenkette anlagern bzw. von dieser abspalten. Dies führt zum einen dazu, dass His sowohl im Kern eines Proteins als auch an der Oberfläche liegen und somit Arg ersetzen kann, ohne eine große Konformationsänderung des Enzyms hervorzurufen. Zum anderen kann His ebenso wie Arg im protonierten Zustand Wasserstoffbrücken bilden, um das Enzym zu stabilisieren und damit die Funktion des Arg32 übernehmen (Betts und Russell 2003). Schubert et al. (2012) hatten R32H als möglicherweise Resistenz-assoziierte Mutation diskutiert, da im Stamm 215-12 neben dieser Substitution nur die von Bohn et al. (2011) als natürlicher Polymorphismus eingestufte DNA-Pol-Variante D672N aufgetreten war. Allerdings hatte eine frühere Studie die Substitution D672N mit einer Resistenz gegen ACV in Verbindung gebracht (Sauerbrei et al. 2010a). Möglicherweise führt der Austausch D672N in Kombination mit anderen AS-Substitutionen zu einer Resistenz. Auf Basis der hier erzielten Ergebnisse ist also anzunehmen, dass die AS-Substitution D672N in der DNA-Pol für die phänotypische ACV-Resistenz des Stammes 215-12 verantwortlich ist, während R32H in der TK einen natürlichen Polymorphismus darstellt. Zudem ist es eher unwahrscheinlich, dass R32H aufgrund seiner Lage in den ersten 46 AS der TK zu einer ACV-Resistenz führt (Halpern und Smiley 1984). Um diese Hypothese weiter zu untermauern, wurde das rekombinante, aufgereinigte Protein mit dieser AS-Substitution mittels HPLC/UV weiterführend überprüft. Hier, ebenso wie beim DiviTum<sup>TM</sup>-Test mit dem aufgereinigten Protein, zeigte sich abermals ein Vielfaches der Phosphorylierungsaktivität des WT 232, sodass R32H zweifelsfrei als natürlicher Polymorphismus einzuschätzen ist. Aufgrund dieser Ergebnisse ist die Rolle der Substitution D672N in der DNA-Pol erneut abzuklären.

Weiterhin wurde der AS-Austausch **S276N** bezüglich einer ACV-Resistenz getestet. Dieser trat gemeinsam mit der bekannten Resistenzmutation R222H in der TK (Bestman-Smith et al. 2001) des ACV-resistenten HSV-1-Stammes 242-12 auf (Schmidt et al. 2015). Somit konnte anhand dieser Befunde nicht klar beurteilt werden, ob die Mutation R222H allein für die phä-

notypische Resistenz verantwortlich ist oder ob darüber hinaus die Substitution S276N eine Rolle spielt. Die Ergebnisse des DiviTum<sup>TM</sup>-Tests wiesen diese jedoch mit einer positiven Enzymaktivität eindeutig als natürlichen Polymorphismus aus. Sowohl Ser als auch Asn sind polare, ungeladene AS. Asparagin präferiert die Lage auf der Proteinoberfläche, wohingegen Ser aufgrund seiner etwas geringeren Polarität sowohl auf der Oberfläche als auch in der Innenseite des Enzyms liegen kann. Diese Ähnlichkeit und die Lage der Substitution in einer nicht konservierten Genregion führen zu dem Schluss, dass der Austausch S276N weder Auswirkungen auf die Struktur noch auf die Funktion des Gesamtproteins hat. Auch eine Studie von Bohn et al. (2011), in der die an der gleichen Stelle liegende AS-Substitution S276R als natürlicher Polymorphismus ausgewiesen wurde, lässt das in dieser Arbeit erzielte Ergebnis plausibel erscheinen.

Außerdem wurde die Insertion eines Cytosins im homopolymeren Bereich zwischen den nt 1061 und 1065 der TK getestet, die zu einer Veränderung des Leserasters ab nt 356 und infolgedessen zu **N376Stopp** führt. So ist das Enzym um nur eine AS verkürzt, allerdings werden die letzten 20 AS im falschen Leseraster translatiert. Diese Insertion ist in der TK neben den unklaren AS-Austauschen E662D und M1226I in der DNA-Pol des ACV-, PCV- und BVDU-resistenten HSV-1-Stammes 405-12 enthalten (Schubert et al. 2014). Frameshift-Mutationen in sogenannten HotSpots, wie in diesem Fall vorliegend, führen in der Regel zu ACV-Resistenz (Sasadeusz et al. 1997). Das rekombinante Protein N376Stopp zeigte im DiviTum<sup>TM</sup>-Test jedoch eine schwach positive Enzymaktivität. Eine Erklärung hierfür bietet die Annahme, dass es sich bei dieser Mutante um eine TK<sup>R</sup>-Variante handelt, da das Enzym durch die nur geringfügige Verschiebung des Leserasters bzw. Verkürzung noch bedingt aktiv sein konnte. Es ist vorstellbar, dass in Abhängigkeit von der ACV-Dosierung *in vivo* eine unterschiedliche Wirksamkeit erzielt werden kann. Die phänotypisch analysierte ACV-Resistenz könnte jedoch auch durch eine der unklaren AS-Substitutionen in der DNA-Pol verursacht worden sein. Durch das vorzeitige Stoppcodon, welches zur Expression eines trunkierten Proteins führte, besitzt diese Mutante den für die Aufreinigung essentiellen strep-tag nicht mehr. Aus diesem Grund konnte die schwach positive Aktivität des Proteins mit dem Austausch N376Stopp nicht mittels HPLC/UV weiterführend charakterisiert werden.

Die literaturunbekannten AS-Substitutionen M121K und N244H wurden ebenfalls auf eine Resistenzassoziation geprüft. Diese konnten in der TK des ACV-, PCV- und BVDU-resistenten HSV-1-Stammes 285-13, der bislang nicht publiziert wurde, detektiert werden.

Auf Basis der Ergebnisse des DiviTum<sup>TM</sup>-Tests ist die Substitution **M121K** als Resistenz-assoziiert einzustufen, da sich für das entsprechende rekombinante Protein keine Phosphorylierungsaktivität ergeben hatte. Auch der verwandte Austausch M121R ist bereits als Resistenzmutation charakterisiert worden (Sauerbrei et al. 2011), sodass das Ergebnis des TK-Aktivitätstests plausibel erscheint. Methionin an Codon 121 ist Bestandteil einer helicalen Region des TK-Proteins, die sich über die AS 114 bis 130 erstreckt. Mittels van der Waals-Kräfte interagiert dieser Bereich mit der NBS des Enzyms, wobei Met121 direkt mit Arg176 verbunden ist und somit Einfluss auf die Substratbindung ausüben kann (Evans et al. 1998). Eine Substitution dieser AS führt also zu einer Resistenz gegen ACV, obwohl der Austausch in einer nicht konservierten Region stattfindet. Zudem ist die Seitenkette von Lys größer als die von Met, sodass benachbarte AS verdrängt werden und sich möglicherweise die gesamte  $\alpha$ -helicale Struktur dieser Region verändert (Evans et al. 1998, Betts und Russel 2003).

Die zweite unklare AS-Substitution im Stamm 285-13, **N244H**, erwies sich auf Basis der Ergebnisse des DiviTum<sup>TM</sup>-Tests als Polymorphismus mit schwach positiver Phosphorylierungsaktivität. Asparagin besitzt eine lange Seitenkette und liegt bevorzugt auf der Oberfläche von Proteinen. Durch seine Polarität kann Asn gut mit anderen hydrophilen und geladenen Molekülen interagieren. Ein Austausch durch eine andere polare AS hat oft keinen Einfluss auf die Proteinfunktion und -faltung. Histidin ist ebenfalls polar und kann mit seinem pKa-Wert, der nahe am physiologischen pH-Wert liegt, relativ einfach Protonen abspalten oder aufnehmen. Deshalb kann es sowohl auf der Proteinoberfläche als auch auf der Innenseite liegen und mit geladenen Molekülen interagieren (Betts und Russell 2003). Wahrscheinlich wird durch den Austausch von Asn zu His die Stabilität des Proteins nicht beeinträchtigt, da beide AS sehr ähnliche chemische Eigenschaften aufweisen. Allerdings ist es möglich, dass durch die Einführung des großen Imidazolringes in der Seitenkette des His die Konformation des Proteins verändert wird, sodass es weniger Substrat phosphorylieren kann (TK<sup>R</sup>) oder sich die Substratspezifität ändert (TK<sup>A</sup>). Dies würde die schwach positive Phosphorylierungsaktivität der Mutante N244H erklären. Aus diesem Grund wurde die TK-Aktivität des rekombinanten Proteins weiterführend mittels HPLC/UV untersucht. Hierbei ergab sich eine veränderte Substratspezifität, da weniger als 1/15 des dT und ACV überhaupt nicht phosphoryliert wurde (Malartre et al. 2012). Im DiviTum<sup>TM</sup>-Test zeigte sich unter Verwendung von aufgereinigten Proteinen abermals eine schwach positive Phosphorylierungsaktivität. Nach Durchführung des Enzymaktivitätstests und unter Einbezug der Ergebnisse aus HPLC/UV ist fest-

zustellen, dass die Mutationen M121K und N244H für die phänotypische ACV-Resistenz des Stammes 285-13 verantwortlich sind.

Im bisher nicht publizierten HSV-1-Stamm 05-14, der genotypisch aus Abstrichmaterial des selben Patienten charakterisiert wurde, konnte zusätzlich zu den beiden eben diskutierten AS-Austauschen M121K und N244H die Substitution **V238F** identifiziert werden. Interessanterweise erwies sich das nachfolgend etablierte Zellkulturisolat des Stammes 05-14 phänotypisch jedoch nicht als ACV-resistent, sondern als sensitiv. Die genotypische Analyse des Zellkulturüberstands ergab, dass die Resistenzmutationen M121K, N244H und die unklare Substitution V238F nun nicht mehr in der TK enthalten waren, sodass ein ACV-sensitives Virusisolat vorlag, und der Phänotyp des HSV-1-Stammes im Originalmaterial fraglich war. Deshalb war weder auf Grundlage des Phänotyps noch auf Grundlage des Genotyps eine Aussage über eine mögliche Resistenzassoziation des Austausches V238F zu treffen, sodass die Bedeutung der Substitution anderweitig abgeklärt werden musste. Für das rekombinante Protein ergab sich im DiviTum<sup>TM</sup>-Test keine Phosphorylierungsaktivität. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass es sich bei dem Austausch V238F um eine Resistenz-auslösende Mutation handelt. Sowohl Val als auch Phenylalanin (Phe, F) sind hydrophob, liegen also bevorzugt im Inneren des Proteins. Der aromatische Phenylring des Phe kann sich allerdings weniger gut als die C $\beta$ -verzweigte Seitenkette des Val an die Konformation der umliegenden AS anpassen, da er durch seine Aromatizität planar und somit starr ist. Hierdurch werden möglicherweise andere AS verdrängt. Während Val eine chemisch unreaktive Seitenkette besitzt, die selten Verbindungen zu anderen AS bildet, kann Phe mit anderen aromatischen AS durch Stapelwechselwirkungen interagieren. Diese kommen durch die freien  $\pi$ -Elektronen der Ringe zustande (McGaughey et al. 1998). So kann die Substitution von Val durch Phe zum einen durch den Unterschied in der Anpassungsfähigkeit der beiden AS, zum anderen aber auch durch die Entstehung von hemmenden Interaktionen zu einer Änderung der Konformation führen. Hierbei ist zu beachten, dass die dem Val238 benachbart liegende AS Tyr239 über ihre Hydroxygruppe mit der Triphosphat-Bindestelle der TK interagiert (Evans et al. 1998). Eine Beeinträchtigung der Verbindung zwischen ATP-Bindestelle und Tyr239 durch die Einführung des Phe an Codon 238 erklärt die detektierte ACV-Resistenz, auch wenn der Austausch in einer nicht konservierten Region stattfindet. Wegen der Resistenzmutationen M121K und V238F ist also auch eine klinische ACV-Resistenz zu erwarten, obwohl der Stamm 05-14 nach der Anzucht in der Zellkultur einen ACV-sensitiven Phänotyp zeigte. Dies



kann mit dem ursprünglichen Vorliegen einer Virusmischpopulation aus sensitiven und resistenten Viren begründet werden, wobei der resistente Klon wahrscheinlich in der Replikation durch den sensitiven unterdrückt wurde. Dabei muss auch beachtet werden, dass eine phänotypische Resistenz erst ab einem Anteil des resistenten Virus von über 20% nachweisbar ist (Shin et al. 2001). Nur durch die Isolierung der unterschiedlichen Viruskclone mittels Plaque-Aufreinigung wäre eine getrennte genotypische Analyse möglich gewesen. Diese Ergebnisse hätten allerdings keinen Einfluss auf die Ausprägung einer klinischen ACV-Resistenz gehabt, sodass entsprechende Untersuchungen für die weitere antivirale Therapie des Patienten nicht essentiell sind.

Die bislang literaturunbekannte Substitution **G61E** konnte in sechs sequentiell gewonnenen klinischen HSV-1-Stämmen am Institut für Virologie und Antivirale Therapie des Universitätsklinikums Jena detektiert werden (80- bis 82-14 und 130- bis 132-14). Es traten weiterhin die literaturunbekannten Austausche Q15P sowie T27M in der TK und die Substitution T188I in der DNA-Pol der Stämme 81-, 82-, 130- und 131-14 auf. Zusätzlich zeigte sich bei der genotypischen Analyse der Stämme 80-14 und 132-14 eine Insertion von Guanin im homopolymeren Bereich zwischen den nt 430 und 437 der TK, die in einem Stoppcodon an AS-Position 228 resultierte. Für diese Mutation wurde bereits ACV-Resistenz nachgewiesen (Bestman-Smith et al. 2001). Aufgrund von Doppelpeaks in den Sequenzen an der Position des betroffenen Guanins bzw. der Basensubstitution G182A, die den Austausch G61E verursacht, ist davon auszugehen, dass eine Mischpopulation aus mindestens zwei HSV-1-Stämmen vorlag. Phänotypisch konnten Resistenzen gegen ACV, PCV und BVDD nachgewiesen werden. Die unbekannten AS-Austausche Q15P und T27M traten ebenfalls in den ACV-sensitiven Isolaten 194-14 bis 196-14 des gleichen Patienten auf. Deshalb und aufgrund der Lage in den ersten 46 AS des TK-Gens (Halpern und Smiley 1984) ist davon auszugehen, dass diese Substitutionen natürliche Polymorphismen darstellen. Es ist allerdings weiterhin unklar, ob der Austausch G61E oder die bislang literaturunbekannte Mutation T188I in der DNA-Pol für die Resistenz der Stämme ohne das verfrühte Stopp-Codon verantwortlich ist. Aus diesem Grund wurde das rekombinante Protein, in dem Gly an Codon 61 durch Glu substituiert wurde, in der vorliegenden Studie geprüft. Es zeigte sich keine Enzymaktivität, was darauf schließen lässt, dass der Austausch G61E eine Resistenzmutation darstellt. Zudem wurde der am gleichen Codon lokalisierte Austausch G61A von Brunnemann et al. (2016) mittels rekombinanter HSV-1 ebenfalls als Resistenz-assoziierte Mutation charakterisiert.

Glycin an Codon 61 liegt in der aktiven Region der ATP-Bindestelle, die die AS 51 bis 63 umfasst. Hierin ist die klassische AS-Sequenz GXXGXXG enthalten, die einen hochkonservierten Bereich darstellt und auch im aktiven Zentrum vieler anderer viraler, aber auch zellulärer Kinasen zu finden ist (Hanks et al. 1988). Diese bildet einen flexiblen Loop, der nach der Bindung des ATP seine Konformation verändert und so das Substrat in der aktiven Tasche fixiert (Balasubramaniam et al. 1990). Die drei Glycinreste spielen hierbei eine wichtige Rolle, da ihre Seitenkette aus einem einzigen Wasserstoffatom besteht. Aus diesem Grund sind sie als einzige AS dazu in der Lage, mittels ihrer Hauptkette eine Phosphatgruppe zu binden. Im Fall der herpesviralen TK interagiert jedes Gly mit einer der drei Phosphatgruppen des ATP, sodass das Substrat im aktiven Zentrum des Enzyms verankert wird (Betts und Russell 2003). Durch den Austausch des letztens Gly durch Glu ist diese Funktionalität nicht mehr gegeben. Glu besitzt eine große Seitenkette, sodass es ihm nicht möglich ist, Phosphatgruppen zu binden. Zudem wird durch die Größe dieser AS die Substratbindetasche eingeengt und infolgedessen die Anpassung an das Substrat ATP behindert. Auf diese Weise verliert die TK durch die Substitution G61E ihre Fähigkeit, ATP zu binden und damit dT bzw. Nukleosidanaloga zu phosphorylieren. Dies resultiert in phänotypischer Resistenz gegen Nukleosidanaloga. Unabhängig davon ist die Rolle der Pol-Variante T188I in weiteren Testen abzuklären.

## 7 Schlussfolgerung

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass ortsspezifische Mutagenese und das modifizierte DiviTum<sup>TM</sup>-Testsystem geeignete Methoden zur zuverlässigen Charakterisierung unklarer AS-Austausche im TK-Gen von HSV-1 darstellen. Auf diese Weise konnten 20 bislang nicht zweifelsfrei charakterisierte Substitutionen hinsichtlich ihrer Bedeutung für eine ACV-Resistenz analysiert werden: Elf Austausche wurden als natürliche Polymorphismen (Q15K, R20C, R32H, E43A, E43D, R89H, A156V, P269S, G271V, S276N, I326V) und sieben als Resistenzmutationen (G61E, A93V, R163G, P173Del, M121K, V238F, G264V) klassifiziert. Diese Ergebnisse sind relevant für eine rasche genotypische Testung von HSV-1-Stämmen bei klinischem Verdacht auf eine ACV-Resistenz, sodass frühestmöglich eine adäquate Therapie eingeleitet werden kann. Zwei AS-Substitutionen erwiesen sich allerdings als Polymorphismen, die mit einer schwach positiven Phosphorylierungsaktivität der TK einhergingen (N244H, N376Stopp). Dabei ist zu beachten, dass die Aktivität schwach positiver Enzymaktivitäten mittels DiviTum<sup>TM</sup>-Test hinsichtlich einer ACV-Resistenz nicht abschließend beurteilt werden kann, da mit BrdU anstelle von ACV als Substrat für die TK falsch positive Ergebnisse möglich sind. Aus diesem Grund sollte auf der Basis von HPLC/UV eine alternative Methode mit ACV bzw. dT als Substrat der rekombinanten TK zur Verfügung gestellt werden. Hierbei dienten rekombinante TK-Proteine, die mittels strep-tag-Affinitätschromatographie aufgereinigt worden waren, zur Phosphorylierung von ACV und dT. Die mittels HPLC/UV erhaltenen Ergebnisse sind im Gegensatz zu Ergebnissen aus LC/MS/MS als äußerst zuverlässig zu bewerten. Die in der vorliegenden Arbeit neu etablierte Methode der HPLC/UV erlaubt nicht nur, widersprüchliche oder unklare Resultate des DiviTum<sup>TM</sup>-Assays weiterführend zu analysieren, sondern auch die therapeutisch relevante Einteilung von Resistenzmutationen in die Kategorien TK<sup>-</sup>, TK<sup>R</sup> und TK<sup>A</sup> vorzunehmen. Um verkürzte Proteine, bei denen der strep-tag am Ende nicht angefügt werden kann, künftig ebenfalls mit dieser Methode testen zu können, wird empfohlen, den strep-tag an den N-Terminus des Proteins zu klonieren oder die Aufreinigung mittels dT-beschichteter Säulen durchzuführen.

In weiteren Untersuchungen ist es sinnvoll, Synergismen zwischen verschiedenen AS-Substitutionen abzuklären, da auch so die TK-Funktion durch eine Änderung der Proteinkonformation beeinflusst werden kann. Hierfür sowie zur Charakterisierung weiterer unklarer AS-Austausche bietet sich ebenfalls die Mutagenese mit anschließendem DiviTum<sup>TM</sup>-Test bzw. HPLC/UV an. Zum tieferen Verständnis solcher Synergismen tragen Kristallstruktur (Champness et al. 1998, Evans et al. 1998) und *in silico* Analysen (Hussin et al. 2013) ver-

schiedener Mutanten des Enzyms bei. Zudem ist es erstrebenswert, ein System zu entwickeln, mit dem unklare AS-Substitutionen in der DNA-Pol hinsichtlich einer Resistenzassoziation geprüft werden können. Da sowohl der DiviTum<sup>TM</sup>-Test als auch HPLC/UV ausschließlich für die Analyse unklarer AS-Substitutionen in der TK geeignet sind, empfiehlt sich die Synthese rekombinanter HSV mittels Cosmid-Sets (Bestman-Smith und Boivin 2003, Piret et al. 2015) oder BAC-Technologie (Brunnemann et al. 2016). Diese Methoden erlauben das Einbringen gewünschter Austausche sowohl in die TK als auch in die DNA-Pol replikationsfähiger Viren, sodass nachfolgend mittels herkömmlicher phänotypischer Analyse die Resistenztestung erfolgen kann. Entsprechende Resultate würden die Interpretation der Ergebnisse schneller genotypischer Resistenztestungen erleichtern und somit die adäquate antivirale Therapie von HSV-Infektionen wesentlich verbessern.

## 8 Literaturverzeichnis

- 1 Adam E, Kaufman RH, Mirkovic RR, Melnick JL. 1979. Persistence of Virus Shedding in Asymptomatic Women after Recovery from Herpes Genitalis. *Obstet Gynecol*, 54(2):171–173.
- 2 Aghi M, Martuza RL. 2005. Oncolytic Viral Therapies - The Clinical Experience. *Oncogene*, 24(52):7802–7816.
- 3 Akhtar J, Shukla D. 2009. Viral Entry Mechanisms: Cellular and Viral Mediators of Herpes Simplex Virus Entry. *FEBS J*, 276(24):7228–7236.
- 4 American Society of Health-System Pharmacists. 1999. *AHFS Drug Information®*. Bethesda: American Hospital Formulary Service.
- 5 Bacon TH, Levin MJ, Leary JJ, Sarisky RT, Sutton D. 2003. Herpes Simplex Virus Resistance to Acyclovir and Penciclovir after Two Decades of Antiviral Therapy. *Clin Microbiol Rev*, 16(1):114–128.
- 6 Bacovsky J, Myslivecek M, Minarik J, Scudla V, Pika T, Zapletalova J, Petrova P, Bartkova M, Adam T, Gronowitz SJ. 2014. Analysis of Thymidine Kinase Serum Levels by Novel Method DiviTum in Multiple Myeloma and Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance - Comparison with Imaging Methods 99mTc-MIBI Scintigraphy and 18F-FDG PET/CT. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 159(1):135–138.
- 7 Bae PK, Kim JH, Kim HS, Chung IK, Paik SG, Lee C-K. 2006. Intracellular Uptake of Thymidine and Antiherpetic Drugs for Thymidine Kinase-Deficient Mutants of Herpes Simplex Virus Type 1. *Antiviral Res*, 70(3):93–104.
- 8 Bagg J, Mannings A, Munro J, Walker DM. 1989. Rapid Diagnosis of Oral Herpes Simplex or Zoster Virus Infections by Immunofluorescence: Comparison with Tzanck Cell Preparations and Viral Culture. *Br Dent J*, 167(7):235–238.
- 9 Baines JD. 2011. Herpes Simplex Virus Capsid Assembly and DNA Packaging: A Present and Future Antiviral Drug Target. *Trends Microbiol*, 19(12):606–613.

- 
- 10 Balasubramaniam NK, Veerisetty V, Gentry GA. 1990. Herpesviral Deoxythymidine Kinases Contain a Site Analogous to the Phosphoryl-Binding Arginine-Rich Region of Porcine Adenylate Kinase; Comparison of Secondary Structure Predictions and Conservation. *J Gen Virol*, 71(12):2979–2987.
  - 11 Balliet JW, Min JC, Cabatingan MS, Schaffer PA. 2005. Site-Directed Mutagenesis of Large DNA Palindromes: Construction and in vitro Characterization of Herpes Simplex Virus Type 1 Mutants Containing Point Mutations that Eliminate the oriL or oriS Initiation Function. *J Virol*, 79(20):12783–12797.
  - 12 Bergström T, Trybala E. 1996. Antigenic Differences between HSV-1 and HSV-2 Glycoproteins and their Importance for Type-specific Serology. *Intervirology*, 39(3):176–184.
  - 13 Bernad A, Lazaro JM, Salas M, Blanco L. 1990. The Highly Conserved Amino Acid Sequence Motif Tyr-Gly-Asp-Thr-Asp-Ser in Alpha-like DNA Polymerases is Required by Phage Phi 29 DNA Polymerase for Protein-Primed Initiation and Polymerization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(12):4610–4614.
  - 14 Bestman-Smith J, Boivin G. 2003. Drug Resistance Patterns of Recombinant Herpes Simplex Virus DNA Polymerase Mutants Generated with a Set of Overlapping Cosmids and Plasmids. *J Virol*, 77(14):7820–7829.
  - 15 Bestman-Smith J, Schmit I, Papadopoulou B, Boivin G. 2001. Highly Reliable Heterologous System for Evaluating Resistance of Clinical Herpes Simplex Virus Isolates to Nucleoside Analogues. *J Virol*, 75(7):3105–3110.
  - 16 Beswick TS. 1962. The Origin and the Use of the Word Herpes. *Med Hist*, 6(3):214–232.
  - 17 Betts MJ, Russell RB. 2003. Amino Acid Properties and Consequences of Substitutions. In: Barnes MR, Gray IC, Hrsg. *Bioinformatics for Geneticists*. Erste Aufl. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.
  - 18 Biswas S, Field HJ. 2008. Herpes Simplex Virus Helicase-Primase Inhibitors: Recent Findings from the Study of Drug Resistance Mutations. *Antivir Chem Chemother*, 19(1):1–6.

- 19 Biswas S, Smith C, Field HJ. 2007. Detection of HSV-1 Variants Highly Resistant to the Helicase-Primase Inhibitor BAY 57-1293 at High Frequency in 2 of 10 Recent Clinical Isolates of HSV-1. *J Antimicrob Chemother*, 60(2):274–279.
- 20 Black ME, Loeb LA. 1993. Identification of Important Residues within the Putative Nucleoside Binding Site of HSV-1 Thymidine Kinase by Random Sequence Selection: Analysis of Selected Mutants In Vitro. *Biochemistry*, 32(43):11618–11626.
- 21 Boehmer PE, Lehman IR. 1997. Herpes Simplex Virus DNA Replication. *Annu Rev Biochem*, 66(1):347–384.
- 22 Bohn K, Zell R, Schacke M, Wutzler P, Sauerbrei A. 2011. Gene Polymorphism of Thymidine Kinase and DNA Polymerase in Clinical Strains of Herpes Simplex Virus. *Antivir Ther*, 16(7):989–997.
- 23 Boivin G. 1998. Drug-Resistant Herpesviruses: Should We Look For Them? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 17(8):539–541.
- 24 Bolayirli M, Papila C, Korkmaz GG, Papila B, Aydogan F, Karatas A, Uzun H. 2013. Serum Thymidine Kinase 1 Activity in Solid Tumor (Breast and Colorectal Cancer) Patients Treated with Adjuvant Chemotherapy. *J Clin Lab Anal*, 27(3):220–226.
- 25 Brady RC, Bernstein DI. 2004. Treatment of Herpes Simplex Virus Infections. *Antiviral Res*, 61(2):73–81.
- 26 Bras AP, Sitar DS, Aoki FY. 2001. Comparative Bioavailability of Acyclovir from Oral Valacyclovir and Acyclovir in Patients Treated for Recurrent Genital Herpes Simplex Virus Infection. *Can J Clin Pharmacol*, 8(4):207–211.
- 27 Brown DG, Visse R, Sandhu G, Davies A, Rizkallah PJ, Melitz C, Summers WC, Sanderson MR. 1995. Crystal Structures of the Thymidine Kinase from Herpes Simplex Virus Type-1 in Complex with Deoxythymidine and Ganciclovir. *Nat Struct Biol*, 2(10):876–881.
- 28 Brown ZA, Benedetti J, Ashley R, Burchett S, Selke S, Berry S, Vontver LA, Corey L. 1991. Neonatal Herpes Simplex Virus Infection in Relation to Asymptomatic Maternal Infection at the Time of Labor. *N Engl J Med*, 324(18):1247–1252.

- 
- 29 Brunnemann A-K, Liermann K, Deinhardt-Emmer S, Maschkowitz G, Pohlmann A, Sodeik B, Fickenscher H, Sauerbrei A, Krumbholz A. 2016. Recombinant Herpes Simplex Virus Type 1 Strains with Targeted Mutations Relevant for Aciclovir Susceptibility. *Sci Rep*, 6:29903.
- 30 Burrel S, Aime C, Hermet L, Ait-Arkoub Z, Agut H, Boutolleau D. 2013. Surveillance of Herpes Simplex Virus Resistance to Antivirals: A 4-year Survey. *Antiviral Res*, 100(2):365–372.
- 31 Burrel S, Bonnafe P, Hubacek P, Agut H, Boutolleau D. 2012. Impact of Novel Mutations of Herpes Simplex Virus 1 and 2 Thymidine Kinases on Acyclovir Phosphorylation Activity. *Antiviral Res*, 96(3):386–390.
- 32 Burrel S, Deback C, Agut H, Boutolleau D. 2010. Genotypic Characterization of UL23 Thymidine Kinase and UL30 DNA Polymerase of Clinical Isolates of Herpes Simplex Virus: Natural Polymorphism and Mutations Associated with Resistance to Antivirals. *Antimicrob Agents Chemother*, 54(11):4833–4842.
- 33 Chakrabarti S, Pillay D, Ratcliffe D, Cane PA, Collingham KE, Milligan DW. 2000. Resistance to Antiviral Drugs in Herpes Simplex Virus Infections among Allogeneic Stem Cell Transplant Recipients: Risk Factors and Prognostic Significance. *J Infect Dis*, 181(6):2055–2058.
- 34 Champness JN, Bennett MS, Wien F, Visse R, Summers WC, Herdewijn P, Clerq E de, Ostrowski T, Jarvest RL, Sanderson MR. 1998. Exploring the Active Site of Herpes Simplex Virus Type-1 Thymidine Kinase by X-Ray Crystallography of Complexes with Aciclovir and Other Ligands. *Proteins*, 32(3):350–361.
- 35 Chayavichitsilp P, Buckwalter JV, Krakowski AC, Friedlander SF. 2009. Herpes Simplex. *Pediatr Rev*, 30(4):119–129.
- 36 Chibo D, Mijch A, Doherty R, Birch C. 2002. Novel Mutations in the Thymidine Kinase and DNA Polymerase Genes of Acyclovir and Foscarnet Resistant Herpes Simplex Viruses Infecting an Immunocompromised Patient. *J Clin Virol*, 25(2):165–170.



- 
- 37 Chono K, Katsumata K, Kontani T, Kobayashi M, Sudo K, Yokota T, Konno K, Shimizu Y, Suzuki H. 2010. ASP2151, a Novel Helicase-Primase Inhibitor, Possesses Antiviral Activity Against Varicella-Zoster Virus and Herpes Simplex Virus Types 1 and 2. *J Antimicrob Chemother*, 65(8):1733–1741.
- 38 Clement C, Tiwari V, Scanlan PM, Valyi-Nagy T, Yue, Beatrice Y J T, Shukla D. 2006. A Novel Role for Phagocytosis-like Uptake in Herpes Simplex Virus Entry. *J Cell Biol*, 174(7):1009–1021.
- 39 Coen DM. 1994. Acyclovir-Resistant, Pathogenic Herpesviruses. *Trends Microbiol*, 2(12):481–485.
- 40 Crumpacker CS. 1992. Mechanism of Action of Foscarnet Against Viral Polymerases. *Am J Med*, 92(2):3–7.
- 41 Crumpacker CS, Schnipper LE, Marlowe SI, Kowalsky PN, Hershey BJ, Levin MJ. 1982. Resistance to Antiviral Drugs of Herpes Simplex Virus Isolated from a Patient Treated with Acyclovir. *N Engl J Med*, 306(6):343–346.
- 42 Crute JJ, Lehman IR. 1989. Herpes simplex-1 DNA Polymerase. Identification of an Intrinsic 5'----3' Exonuclease with Ribonuclease H Activity. *J Biol Chem*, 264(32):19266–19270.
- 43 Danve-Szatanek C, Aymard M, Thouvenot D, Morfin F, Agius G, Bertin I, Billaudel S, Chanzy B, Coste-Burel M, Finkielsztejn L, Fleury H, Hadou T, Henquell C, Lafeuille H, Lafon ME, Le Faou A, Legrand MC, Maille L, Mengelle C, Morand P, Morinet F, Nicand E, Omar S, Picard B, Pozzetto B, Puel J, Raoult D, Scieux C, Segondy M, Seigneurin JM, Teyssou R, Zandotti C. 2004. Surveillance Network for Herpes Simplex Virus Resistance to Antiviral Drugs: 3-Year Follow-Up. *J Clin Microbiol*, 42(1):242–249.
- 44 Darai G. 2009. *Lexikon der Infektionskrankheiten des Menschen*. Dritte Aufl. Heidelberg: Springer.
- 45 Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, Hayward GS, McGeoch DJ, Minson AC, Pellett PE, Roizman B, Studdert MJ, Thiry E. 2009. The Order Herpesvirales. *Arch Virol*, 154(1):171–177.

- 46 De Clercq E. 2004a. Antiviral Drugs in Current Clinical Use. *J Clin Virol*, 30(2):115–133.
- 47 De Clercq E. 2004b. Discovery and Development of BVDU (Brivudin) as a Therapeutic for the Treatment of Herpes Zoster. *Biochem Pharmacol*, 68(12):2301–2315.
- 48 Dingwell KS, Johnson DC. 1998. The Herpes Simplex Virus gE-gI Complex Facilitates Cell-to-Cell Spread and Binds to Components of Cell Junctions. *J Virol*, 72(11):8933–8942.
- 49 Doerr HW, Gerlich WH, Hrsg. 2009. Medizinische Virologie, Grundlagen, Diagnostik und Therapie virologischer Krankheitsbilder. Zweite Aufl. Stuttgart: Thieme.
- 50 Duan R, de Vries, Rory D, Osterhaus, Albert D M E, Remeijer L, Verjans, Georges M G M. 2008. Acyclovir-Resistant Corneal HSV-1 Isolates from Patients with Herpetic Keratitis. *J Infect Dis*, 198(5):659–663.
- 51 Duan R, de Vries, Rory D, van Dun, Jessica M, van Loenen, Freek B, Osterhaus, Albert D M E, Remeijer L, Verjans, Georges M G M. 2009. Acyclovir Susceptibility and Genetic Characteristics of Sequential Herpes Simplex Virus Type 1 Corneal Isolates from Patients with Recurrent Herpetic Keratitis. *J Infect Dis*, 200(9):1402–1414.
- 52 Elion GB. 1982. Mechanism of Action and Selectivity of Acyclovir. *Am J Med*, 73(1):7–13.
- 53 Englund JA, Zimmerman ME, Swierkosz EM, Goodman JL, Scholl DR, Balfour, H H Jr. 1990. Herpes Simplex Virus Resistant to Acyclovir. A Study in a Tertiary Care Center. *Ann Intern Med*, 112(6):416–422.
- 54 Evans JS, Lock KP, Levine BA, Champness JN, Sanderson MR, Summers WC, McLeish PJ, Buchan A. 1998. Herpesviral Thymidine Kinases: Laxity and Resistance by Design. *J Gen Virol*, 79(9):2083–2092.
- 55 Everett RD, Earnshaw WC, Findlay J, Lomonte P. 1999. Specific Destruction of Kinetochore Protein CENP-C and Disruption of Cell Division by Herpes Simplex Virus Immediate-Early Protein Vmw110. *EMBO J*, 18(6):1526–1538.

- 
- 56 Fatahzadeh M, Schwartz RA. 2007. Human Herpes Simplex Virus Infections: Epidemiology, Pathogenesis, Symptomatology, Diagnosis, and Management. *J Am Acad Dermatol*, 57(5):737–763.
- 57 Field HJ, Huang M-L, Lay EM, Mickleburgh I, Zimmermann H, Birkmann A. 2013. Baseline Sensitivity of HSV-1 and HSV-2 Clinical Isolates and Defined Acyclovir-Resistant Strains to the Helicase–Primase Inhibitor Pritelivir. *Antiviral Res*, 100(2):297–299.
- 58 Field HJ, Wildy P. 1978. The Pathogenicity of Thymidine Kinase-Deficient Mutants of Herpes Simplex Virus in Mice. *J Hyg*, 81(2):267–277.
- 59 Field HJ, Wildy P. 1982. Clinical Resistance of Herpes Simplex Virus to Acyclovir. *Lancet*, 1(8281):1125.
- 60 Fife KH, Crumpacker CS, Mertz GJ, Hill EL, Boone GS. 1994. Recurrence and Resistance Patterns of Herpes Simplex Virus following Cessation of  $\geq 6$  Years of Chronic Suppression with Acyclovir. *J Infect Dis*, 169(6):1338–1341.
- 61 Folkers G, Krickl S, Trumpp S. 1989. Lokalisierung der für die Bindung von antiviralen Wirkstoffen essentiellen Strukturbereiche in Thymidinkinasen durch Sequenzhomologiestudien. *Arch Pharm Pharm Med Chem (Archiv der Pharmazie)*, 322(7):409–413.
- 62 Frobert E, Burrel S, Ducastelle-Lepretre S, Billaud G, Ader F, Casalegno J-S, Nave V, Boutolleau D, Michallet M, Lina B, Morfin F. 2014. Resistance of Herpes Simplex Viruses to Acyclovir: An Update from a Ten-Year Survey in France. *Antiviral Res*, 111(0):36–41.
- 63 Frobert E, Cortay J-C, Ooka T, Najioullah F, Thouvenot D, Lina B, Morfin F. 2008. Genotypic Detection of Acyclovir-Resistant HSV-1: Characterization of 67 ACV-Sensitive and 14 ACV-Resistant Viruses. *Antiviral Res*, 79(1):28–36.
- 64 Frobert E, Ooka T, Cortay JC, Lina B, Thouvenot D, Morfin F. 2005. Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase Mutations Associated with Resistance to Acyclovir: A Site-Directed Mutagenesis Study. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(3):1055–1059.

- 
- 65 Gärtner B, Müller-Lantzsch N. 2002. Herpesviren: Allgemein. In: Doerr HW, Gerlich WH, Hrsg. Medizinische Virologie, Grundlagen, Diagnostik und Therapie virologischer Krankheitsbilder. Erste Aufl. Stuttgart: Thieme, 370-372.
- 66 Gaudreau A, Hill E, Balfour, H H Jr, Erice A, Boivin G. 1998. Phenotypic and Genotypic Characterization of Acyclovir-Resistant Herpes Simplex Viruses from Immunocompromised Patients. *J Infect Dis*, 178(2):297–303.
- 67 Gerber S, Folkers G. 1996. A New Method for Quantitative Determination of Tritium-Labeled Nucleoside Kinase Products Adsorbed on DEAE-Cellulose. *Biochem Biophys Res Com*, 225(1):263–267.
- 68 Gerna G, Baldanti F, Zavattoni M, Sarasini A, Percivalle E, Revello MG. 1992. Monitoring of Ganciclovir Sensitivity of Multiple Human Cytomegalovirus Strains Coinfecting Blood of an AIDS Patient by an Immediate-Early Antigen Plaque Assay. *Antiviral Res*, 19(4):333–345.
- 69 Gilbert C, Bestman-Smith J, Boivin G. 2002. Resistance of Herpesviruses to Antiviral Drugs: Clinical Impacts and Molecular Mechanisms. *Drug Resist Updat*, 5(2):88–114.
- 70 Graham D, Larder BA, Inglis MM. 1986. Evidence that the 'Active Centre' of the Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase Involves an Interaction Between Three Distinct Regions of the Polypeptide. *J Gen Virol*, 67(4):753–758.
- 71 Grinde B. 2013. Herpesviruses: Latency and Reactivation - Viral Strategies and Host Response. *J Oral Microbiol*, 5(1):22766.
- 72 Grünewald K, Desai P, Winkler DC, Heymann JB, Belnap DM, Baumeister W, Steven AC. 2003. Three-Dimensional Structure of Herpes Simplex Virus from Cryo-Electron Tomography. *Science*, 302(5649):1396–1398.
- 73 Halpern ME, Smiley JR. 1984. Effects of Deletions on Expression of the Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase Gene from the Intact Viral Genome: The Amino Terminus of the Enzyme is Dispensable for Catalytic Activity. *J Virol*, 50(3):733–738.
- 74 Hanks SK, Quinn AM, Hunter T. 1988. The Protein Kinase Family: Conserved Features and Deduced Phylogeny of the Catalytic Domains. *Science*, 241(4861):42–52.

- 
- 75 Hardwicke MA, Sandri-Goldin RM. 1994. The Herpes Simplex Virus Regulatory Protein ICP27 Contributes to the Decrease in Cellular mRNA Levels During Infection. *J Virol*, 68(8):4797–4810.
- 76 Henaff D, Radtke K, Lippé R. 2012. Herpesviruses Exploit Several Host Compartments for Envelopment. *Traffic*, 13(11):1443–1449.
- 77 Hernandez TR, Lehman IR. 1990. Functional Interaction Between the Herpes Simplex-1 DNA Polymerase and UL42 Protein. *J Biol Chem*, 265(19):11227–11232.
- 78 Hesse M, Meier H, Zeeh B. 2012. *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. Achte Aufl. Stuttgart: Thieme.
- 79 Hill EL, Hunter GA, Ellis MN. 1991. In vitro and in vivo Characterization of Herpes Simplex Virus Clinical Isolates Recovered from Patients Infected with Human Immunodeficiency Virus. *Antimicrob Agents Chemother*, 35(11):2322–2328.
- 80 Hruby DE, Ball LA. 1981. Control of Expression of the Vaccinia Virus Thymidine Kinase Gene. *J Virol*, 40(2):456–464.
- 81 Huff JL, Barry PA. 2003. B-virus (Cercopithecine Herpesvirus 1) Infection in Humans and Macaques: Potential for Zoonotic Disease. *Emerg Infect Dis*, 9(2):246–250.
- 82 Hussin A, Md Nor NS, Ibrahim N. 2013. Phenotypic and Genotypic Characterization of Induced Acyclovir-resistant Clinical Isolates of Herpes Simplex Virus Type 1. *Antiviral Res*, 100(2):306–313.
- 83 Hwang CB, Horsburgh B, Pelosi E, Roberts S, Digard P, Coen DM. 1994. A Net +1 Frameshift Permits Synthesis of Thymidine Kinase From a Drug-Resistant Herpes Simplex Virus Mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(12):5461–5465.
- 84 Invitrogen Life Technologies. 2002. High fidelity and High Specificity - AccuPrime™ Pfx DNA Polymerase Gives You Both. Carlsbad: Invitrogen Corporation.
- 85 Jamieson AT, Subak-Sharpe JH. 1974. Biochemical Studies on the Herpes Simplex Virus-Specified Deoxypyrimidine Kinase Activity. *J Gen Virol*, 24(3):481–492.
- 86 Jenkins FJ, Turner SL. 1996. Herpes Simplex Virus: A Tool for Neuroscientists. *Front Biosci*, 1(1):241–247.

- 
- 87 Jones CL. 1996. Herpes Simplex Virus Infection in the Neonate: Clinical Presentation and Management. *Neonatal Netw*, 15(8):11–15.
- 88 Kang W, Mukerjee R, Fraser NW. 2003. Establishment and Maintenance of HSV Latent Infection is Mediated through Correct Splicing of the LAT Primary Transcript. *Virology*, 312(1):233–244.
- 89 Karaba AH, Cohen LK, Glaubach T, Kopp SJ, Reichel JL, Yoon HH, Zheng XT, Muller WJ. 2012. Longitudinal Characterization of Herpes Simplex Virus (HSV) Isolates Acquired from Different Sites in an Immune-Compromised Child: A New HSV Thymidine Kinase Mutation Associated with Resistance. *J Pediatric Infect Dis Soc*, 1(2):116–124.
- 90 Karamitros T, Harrison I, Piorkowska R, Katzourakis A, Magiorkinis G, Mbisa JL. 2016. De Novo Assembly of Human Herpes Virus Type 1 (HHV-1) Genome, Mining of Non-Canonical Structures and Detection of Novel Drug-Resistance Mutations Using Short- and Long-Read Next Generation Sequencing Technologies. *PloS one*, 11(6):e0157600.
- 91 Kieff ED, Bachenheimer SL, Roizman B. 1971. Size, Composition, and Structure of the Deoxyribonucleic Acid of Herpes Simplex Virus Subtypes 1 and 2. *J Virol*, 8(2):125–132.
- 92 Kimura H, Shibata M, Kuzushima K, Nishikawa K, Nishiyama Y, Morishima T. 1990. Detection and Direct Typing of Herpes Simplex Virus by Polymerase Chain Reaction. *Med Microbiol Immunol*, 179(4):177–184.
- 93 King AM, Adams MJ, Lefkowitz EJ, Carstens EB. 2012. Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Amsterdam: Elsevier.
- 94 King DH. 1988. History, Pharmacokinetics, and Pharmacology of Acyclovir. *J Am Acad Dermatol*, 18(1):176–179.
- 95 Kit S, Kit M, Qavi H, Trkula D, Otsuka H. 1983. Nucleotide Sequence of the Herpes Simplex Virus Type 2 (HSV-2) Thymidine Kinase Gene and Predicted Amino Acid Sequence of Thymidine Kinase Polypeptide and its Comparison with the HSV-1 Thymidine Kinase Gene. *Biochim Biophys Acta*, 741(2):158–170.

- 
- 96 Kleymann G, Fischer R, Betz, Ulrich A K, Hendrix M, Bender W, Schneider U, Handke G, Eckenberg P, Hewlett G, Pevzner V, Baumeister J, Weber O, Henninger K, Keldenich J, Jensen A, Kolb J, Bach U, Popp A, Maben J, Frappa I, Haebich D, Lockhoff O, Rubsamen-Waigmann H. 2002. New Helicase-Primase Inhibitors as Drug Candidates for the Treatment of Herpes Simplex Disease. *Nat Med*, 8(4):392–398.
- 97 Knopf KW. 1979. Properties of Herpes Simplex Virus DNA Polymerase and Characterization of its Associated Exonuclease Activity. *Eur J Biochem*, 98(1):231–244.
- 98 Kozak M. 1981. Possible Role of Flanking Nucleotides in Recognition of the AUG Initiator Codon by Eukaryotic Ribosomes. *Nucleic Acids Res*, 9(20):5233–5252.
- 99 Kraft M. 1976. Struktur und Absorptionsspektroskopie Organischer Naturstoffe. In: Brügel W, Ertel S, Holldorf AW, Hrsg. Wissenschaftliche Forschungsberichte, Reihe I: Grundlagenforschung und grundlegende Methodik, Abteilung A: Chemie und Physik, Band 27. Erste Aufl. Darmstadt: Dr. Dietrich Steinkopf Verlag.
- 100 Kudo E, Shiota H, Naito T, Satake K, Itakura M. 1998. Polymorphisms of Thymidine Kinase Gene in Herpes Simplex Virus Type 1: Analysis of Clinical Isolates From Herpetic Keratitis Patients and Laboratory Strains. *J Med Virol*, 56(2):151–158.
- 101 Kunkel TA. 2004. DNA Replication Fidelity. *J Biol Chem*, 279(17):16895–16898.
- 102 Kusne S, Schwartz M, Breinig MK, Dummer JS, Lee RE, Selby R, Starzl TE, Simmons RL, Ho M. 1991. Herpes Simplex Virus Hepatitis after Solid Organ Transplantation in Adults. *J Infect Dis*, 163(5):1001–1007.
- 103 Kwong AD, Kruper JA, Frenkel N. 1988. Herpes Simplex Virus Virion Host Shutoff Function. *J Virol*, 62(3):912–921.
- 104 Lafferty WE, Downey L, Celum C, Wald A. 2000. Herpes Simplex Virus Type 1 as a Cause of Genital Herpes: Impact on Surveillance and Prevention. *J Infect Dis*, 181(4):1454–1457.
- 105 Larder BA, Cheng YC, Darby G. 1983. Characterization of Abnormal Thymidine Kinases Induced by Drug-resistant Strains of Herpes Simplex Virus Type 1. *J Gen Virol*, 64(3):523–532.

- 
- 106 Larder BA, Darby G. 1984. Virus Drug-Resistance: Mechanisms and Consequences. *Antiviral Res*, 4(1):1–42.
- 107 Larder BA, Darby G. 1985. Selection and Characterisation of Acyclovir-Resistant Herpes Simplex Virus Type 1 Mutants Inducing Altered DNA Polymerase Activities. *Virology*, 146(2):262–271.
- 108 Lee NY, Tang Y-W, Espy MJ, Kolbert CP, Rys PN, Mitchell PS, Day SP, Henry SL, Persing DH, Smith TF. 1999. Role of Genotypic Analysis of the Thymidine Kinase Gene of Herpes Simplex Virus for Determination of Neurovirulence and Resistance to Acyclovir. *J Clin Microbiol*, 37(10):3171–3174.
- 109 Liu QY, Summers WC. 1988. Site-directed Mutagenesis of a Nucleotide-binding Domain in HSV-1 Thymidine Kinase: Effects on Catalytic Activity. *Virology*, 163(2):638–642.
- 110 Ma JZ, Russell TA, Spelman T, Carbone FR, Tschärke DC. 2014. Lytic Gene Expression Is Frequent in HSV-1 Latent Infection and Correlates with the Engagement of a Cell-Intrinsic Transcriptional Response. *PLoS Pathog*, 10(7):e1004237.
- 111 Malartre N, Boulieu R, Falah N, Cortay J-C, Lina B, Morfin F, Frobert E. 2012. Effects of Mutations on Herpes Simplex Virus 1 Thymidine Kinase Functionality: An in vitro Assay Based on Detection of Monophosphate Forms of Acyclovir and Thymidine Using HPLC/DAD. *Antiviral Res*, 95(3):224–228.
- 112 Marcus B, Lipozencic J, Matz H, Orion E, Wolf R. 2005. Herpes Simplex: Autoinoculation versus Dissemination. *Acta Dermatovenereol Croat*, 13(4):237–241.
- 113 Marcy AI, Hwang CB, Ruffner KL, Coen DM. 1990. Engineered Herpes Simplex Virus DNA Polymerase Point Mutants: The Most Highly Conserved Region Shared among Alpha-like DNA Polymerases is Involved in Substrate Recognition. *J Virol*, 64(12):5883–5890.
- 114 Marsden HS, Haarr L, Preston CM. 1983. Processing of Herpes Simplex Virus Proteins and Evidence that Translation of Thymidine Kinase mRNA is Initiated at Three Separate AUG Codons. *J Virol*, 46(2):434–445.



- 115 Matthews JT, Carroll RD, Stevens JT, Haffey ML. 1989. In vitro Mutagenesis of the Herpes Simplex Virus Type 1 DNA Polymerase Gene Results in Altered Drug Sensitivity of the Enzyme. *J Virol*, 63(11):4913–4918.
- 116 Mattison HR, Eisenberg RJ, Reichmann RC. 1991. Herpes Simplex Virus. In: Belshe RB, Hrsg. *Textbook of Human Virology*. Zweite Aufl. St. Louis: Mosby Year Book, 822-841.
- 117 McGaughey GB, Gagne M, Rappe AK. 1998. Pi-Stacking Interactions. Alive and Well in Proteins. *J Biol Chem*, 273(25):15458–15463.
- 118 McGeoch DJ, Dolan A, Donald S, Rixon FJ. 1985. Sequence Determination and Genetic Content of the Short Unique Region in the Genome of Herpes Simplex Virus Type 1. *J Mol Biol*, 181(1):1–13.
- 119 McGeoch DJ, Rixon FJ, Davison AJ. 2006. Topics in Herpesvirus Genomics and Evolution. *Virus Res Suppl*, 117(1):90–104.
- 120 McLaren C, Ellis MN, Hunter GA. 1983. A Colorimetric Assay for the Measurement of the Sensitivity of Herpes Simplex Viruses to Antiviral Agents. *Antiviral Res*, 3(4):223–234.
- 121 McLauchlan J, Rixon FJ. 1992. Characterization of Enveloped Tegument Structures (L particles) Produced by Alphaherpesviruses: Integrity of the Tegument does not Depend on the Presence of Capsid or Envelope. *J Gen Virol*, 73(2):269–276.
- 122 Mettenleiter TC. 2004. Budding Events in Herpesvirus Morphogenesis. *Virus Res Suppl*, 106(2):167–180.
- 123 Mettenleiter TC, Klupp BG, Granzow H. 2009. Herpesvirus Assembly: An Update. *Virus Res Suppl*, 143(2):222–234.
- 124 Modrow S, Falke D, Truyen U. 2003. *Molekulare Virologie*. Zweite Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- 125 Momméja-Marin H, Lafaurie M, Scieux C, Galicier L, Oksenhendler E, Molina J-M. 2003. Herpes Simplex Virus Type 2 as a Cause of Severe Meningitis in Immunocompromised Adults. *Clin Infect Dis*, 37(11):1527–1533.

- 
- 126 Morfin F, Souillet G, Bilger K, Ooka T, Aymard M, Thouvenot D. 2000a. Genetic Characterization of Thymidine Kinase from Acyclovir-Resistant and -Susceptible Herpes Simplex Virus Type 1 Isolated from Bone Marrow Transplant Recipients. *J Infect Dis*, 182(1):290–293.
- 127 Morfin F, Thouvenot D. 2003. Herpes Simplex Virus Resistance to Antiviral Drugs. *J Clin Virol*, 26(1):29–37.
- 128 Morfin F, Thouvenot D, Aymard M, Souillet G. 2000b. Reactivation of Acyclovir-Resistant Thymidine Kinase-Deficient Herpes Simplex Virus Harboring Single Base Insertion Within a 7 Gs Homopolymer Repeat of the Thymidine Kinase Gene. *J Med Virol*, 62(2):247–250.
- 129 Morfin F, Thouvenot D, Turenne-Tessier M de, Lina B, Aymard M, Ooka T. 1999. Phenotypic and Genetic Characterization of Thymidine Kinase from Clinical Strains of Varicella-Zoster Virus Resistant to Acyclovir. *Antimicrob Agents Chemother*, 43(10):2412–2416.
- 130 Mousseau DD, Raghavendra Rao VL. 1999. Western Blot Analysis. In: Boulton AA, Baker GB, Bateson AN, Hrsg. *In Vitro Neurochemical Techniques*. Erste Aufl. Totowa: Humana Press.
- 131 Müller-Esterl W. 2011. *Biochemie. Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*. Zweite Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- 132 Munir KM, French DC, Dube DK, Loeb LA. 1992. Permissible Amino Acid Substitutions Within the Putative Nucleoside Binding Site of Herpes Simplex Virus Type 1 Encoded Thymidine Kinase Established by Random Sequence Mutagenesis. *J Biol Chem*, 267(10):6584–6589.
- 133 Nicola AV, McEvoy AM, Straus SE. 2003. Roles for Endocytosis and Low pH in Herpes Simplex Virus Entry into HeLa and Chinese Hamster Ovary Cells. *J Virol*, 77(9):5324–5332.
- 134 Nisman B, Nechushtan H, Biran H, Gantz-Sorotsky H, Peled N, Gronowitz S, Peretz T. 2014. Serum Thymidine Kinase 1 Activity in the Prognosis and Monitoring of Chemotherapy in Lung Cancer Patients: A Brief Report. *J Thorac Oncol*, 9(10):1568–1572.

- 135 Nisman B, Yutkin V, Nechushtan H, Gofrit ON, Peretz T, Gronowitz S, Pode D. 2010. Circulating Tumor M2 Pyruvate Kinase and Thymidine Kinase 1 are Potential Predictors for Disease Recurrence in Renal Cell Carcinoma after Nephrectomy. *Urology*, 76(2):513.
- 136 Nugier F, Colin JN, Aymard M, Langlois M. 1992. Occurrence and Characterization of Acyclovir-Resistant Herpes Simplex Virus Isolates: Report on a Two-Year Sensitivity Screening Survey. *J Med Virol*, 36(1):1–12.
- 137 Ohana B, Lipson M, Vered N, Srugo I, Ahdut M, Morag A. 2000. Novel Approach for Specific Detection of Herpes Simplex Virus Type 1 and 2 Antibodies and Immunoglobulin G and M Antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol*, 7(6):904–908.
- 138 Ojala PM, Sodeik B, Ebersold MW, Kutay U, Helenius A. 2000. Herpes Simplex Virus Type 1 Entry into Host Cells: Reconstitution of Capsid Binding and Uncoating at the Nuclear Pore Complex In Vitro. *Mol Cell Biol*, 20(13):4922–4931.
- 139 Oxford JS, Öberg B. 1985. Conquest of Viral Diseases, A Topical Review of Drugs and Vaccines. Erste Aufl. Amsterdam: Elsevier.
- 140 Palu G, Bevilacqua F, Biasolo MA, Parolin C, Tognon M, Romanelli MG, Meloni GA. 1989. Acyclovir Resistance in Herpes Simplex Virus Type 1: Biochemical and Functional Studies on the Thymidine Kinase of the Highly Resistant R100 Strain. *Virus Res*, 13(4):303–318.
- 141 Pan D, Kaye SB, Hopkins M, Kirwan R, Hart IJ, Coen DM. 2014. Common and New Acyclovir Resistant Herpes Simplex Virus-1 Mutants Causing Bilateral Recurrent Herpetic Keratitis in an Immunocompetent Patient. *J Infect Dis*, 209(3):345–349.
- 142 Parris DS, Harrington JE. 1982. Herpes Simplex Virus Variants Restrained to High Concentrations of  $\alpha$ Acyclovir Exist in Clinical Isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, 22(1):71–77.
- 143 Pavic I, Hartmann A, Zimmermann A, Michel D, Hampl W, Schleyer I, Mertens T. 1997. Flow Cytometric Analysis of Herpes Simplex Virus Type 1 Susceptibility to Acyclovir, Ganciclovir, and Foscarnet. *Antimicrob Agents Chemother*, 41(12):2686–2692.

- 
- 144 Pebody RG, Andrews N, Brown D, Gopal R, Melker H de, Francois G, Gatcheva N, Hellenbrand W, Jokinen S, Klavs I, Kojouharova M, Kortbeek T, Kriz B, Prosenc K, Roubalova K, Teocharov P, Thierfelder W, Valle M, van Damme P, Vranckx R. 2004. The Seroepidemiology of Herpes Simplex Virus Type 1 and 2 in Europe. *Sex Transm Infect*, 80(3):185–191.
- 145 Pilger BD, Perozzo R, Alber F, Wurth C, Folkers G, Scapozza L. 1999. Substrate Diversity of Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase. Impact of the Kinematics of the Enzyme. *J Biol Chem*, 274(45):31967–31973.
- 146 Piret J, Boivin G. 2011. Resistance of Herpes Simplex Viruses to Nucleoside Analogues: Mechanisms, Prevalence and Management. *Antimicrob Agents Chemother*, 55(2):459–472.
- 147 Piret J, Boivin G. 2014. Antiviral Drug Resistance in Herpesviruses other than Cytomegalovirus. *Rev Med Virol*, 24(3):186–218.
- 148 Piret J, Goyette N, Eckenroth BE, Drouot E, Gotte M, Boivin G. 2015. Contrasting Effects of W781V and W780V Mutations in Helix N of Herpes Simplex Virus 1 and Human Cytomegalovirus DNA Polymerases on Antiviral Drug Susceptibility. *J Virol*, 89(8):4636–4644.
- 149 Promega. 2014. ADP-Glo™ Kinase Assay. Madison: Promega Corporation.
- 150 Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. 2014. 266. Aufl. Berlin: De Gruyter.
- 151 Rémillard-Labrosse G, Guay G, Lippé R. 2006. Reconstitution of Herpes Simplex Virus Type 1 Nuclear Capsid Egress in Vitro. *J Virol*, 80(19):9741–9753.
- 152 Reske A, Pollara G, Krummenacher C, Chain BM, Katz DR. 2007. Understanding HSV-1 Entry Glycoproteins. *Rev Med Virol*, 17(3):205–215.
- 153 Roche Lexikon Medizin. 1998. Zweite Aufl. München: Urban & Schwarzenberg.
- 154 Roizman B. 1982. The Family Herpesviridae: General Description, Taxonomy, and Classification. In: Roizman B, Hrsg. *The Herpesviruses*. Erste Aufl. New York: Plenum Press, 1-23.
- 155 Roizman B, Baines J. 1991. The Diversity and Unity of Herpesviridae. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 14(2):63–79.

- 
- 156 Roizman B, Knipe DM. 2001. Herpes Simplex Viruses and Their Replication. In: Lippincott Williams & Wilkins, Hrsg. Fields Virology. Vierte Aufl. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2399-2460.
- 157 Roizman B, Togonon M. 1983. Restriction Endonuclease Patterns of Herpes Simplex Virus DNA: Application to Diagnosis and Molecular Epidemiology. In: Cooper M, Hofschneider PH, Koprowski H, Melchers F, Rott R, Schweiger HG, Vogt PK, Zinkernagel R, Bachmann PA, Hrsg. Current Topics in Microbiology and Immunology, New Developments in Diagnostic Virology. Erste Aufl. Heidelberg: Springer, 273–286.
- 158 Royal Pharmaceutical Society of Great Britain. 1999. The Extra Pharmacopoeia. 13. Aufl. London: The Pharmaceutical Press.
- 159 Sacks SL, Wanklin RJ, Reece DE, Hicks KA, Typer, K. L., MD, Coen DM. 1989. Progressive Esophagitis from Acyclovir-Resistant Herpes Simplex: Clinical Roles for DNA Polymerase Mutants and Viral Heterogeneity? *Ann Intern Med*, 111(11):893–899.
- 160 Safrin S, Elbeik T, Phan L, Robinson D, Rush J, Elbaggari A, Mills J. 1994. Correlation Between Response to Acyclovir and Foscarnet Therapy and in vitro Susceptibility Result for Isolates of Herpes Simplex Virus from Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients. *Antimicrob Agents Chemother*, 38(6):1246–1250.
- 161 Saijo M, Suzutani T, Mizuta K, Kurane I, Morikawa S. 2008. Characterization and Susceptibility to Antiviral Agents of Herpes Simplex Virus Type 1 Containing a Unique Thymidine Kinase Gene with an Amber Codon Between the First and the Second Initiation Codons. *Arch Virol*, 153(2):303–314.
- 162 Sandherr M, Einsele H, Hebart H, Kahl C, Kern W, Kiehl M, Massenkeil G, Penack O, Schiel X, Schuettrumpf S, Ullmann AJ, Cornely OA. 2006. Antiviral Prophylaxis in Patients with Haematological Malignancies and Solid Tumours: Guidelines of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society for Hematology and Oncology (DGHO). *Ann Oncol*, 17(7):1051–1059.

- 
- 163 Sasadeusz JJ, Sacks SL. 1996. Spontaneous Reactivation of Thymidine Kinase-Deficient, Acyclovir-Resistant Type-2 Herpes Simplex Virus: Masked Heterogeneity or Reversion? *J Infect Dis*, 174(3):476–482.
- 164 Sasadeusz JJ, Tufaro F, Safrin S, Schubert K, Hubinette MM, Cheung PK, Sacks SL. 1997. Homopolymer Mutational Hot Spots Mediate Herpes Simplex Virus Resistance to Acyclovir. *J Virol*, 71(5):3872–3878.
- 165 Sauerbrei A, Bohn K, Heim A, Hofmann J, Weissbrich B, Schnitzler P, Hoffmann D, Zell R, Jahn G, Wutzler P, Hamprecht K. 2011. Novel Resistance-Associated Mutations of Thymidine Kinase and DNA Polymerase Genes of Herpes Simplex Virus Type 1 and Type 2. *Antivir Ther*, 16(8):1297–1308.
- 166 Sauerbrei A, Bohn-Wippert K, Kaspar M, Krumbholz A, Karrasch M, Zell R. 2016. Database on Natural Polymorphisms and Resistance-Related Non-Synonymous Mutations in Thymidine Kinase and DNA Polymerase Genes of Herpes Simplex Virus Types 1 and 2. *J Antimicrob Chemother*, 71(1):6–16.
- 167 Sauerbrei A, Deinhardt S, Zell R, Wutzler P. 2010a. Phenotypic and Genotypic Characterization of Acyclovir-Resistant Clinical Isolates of Herpes Simplex Virus. *Antiviral Res*, 86(3):246–252.
- 168 Sauerbrei A, Deinhardt S, Zell R, Wutzler P. 2010b. Testing of Herpes Simplex Virus for Resistance to Antiviral Drugs. *Virulence*, 1(6):555–557.
- 169 Sauerbrei A, Liermann K, Bohn K, Henke A, Zell R, Gronowitz S, Wutzler P. 2012. Significance of Amino Acid Substitutions in the Thymidine Kinase Gene of Herpes Simplex Virus Type 1 for Resistance. *Antiviral Res*, 96(2):105–107.
- 170 Sauerbrei A, Vödisch S, Bohn K, Schacke M, Gronowitz S. 2013. Screening of Herpes Simplex Virus Type 1 Isolates for Acyclovir Resistance Using DiviTum(R) Assay. *J Virol Methods*, 188(1-2):70–72.
- 171 Schiffer JT, Corey L. 2010. Herpes Simplex Virus. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, Hrsg. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. Siebte Aufl. Philadelphia/Amsterdam: Churchill Livingstone/Elsevier, 1943–1962.

- 
- 172 Schmidt S, Bohn-Wippert K, Schlattmann P, Zell R, Sauerbrei A. 2015. Sequence Analysis of Herpes Simplex Virus 1 Thymidine Kinase and DNA Polymerase Genes from over 300 Clinical Isolates from 1973 to 2014 Finds Novel Mutations That May Be Relevant for Development of Antiviral Resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 59(8):4938–4945.
- 173 Schmit I, Boivin G. 1999. Characterization of the DNA Polymerase and Thymidine Kinase Genes of Herpes Simplex Virus Isolates from AIDS Patients in whom Acyclovir and Foscarnet Therapy Sequentially Failed. *J Infect Dis*, 180(2):487–490.
- 174 Schneweis K-E. 2001. Herpes-Viren. In: Köhler W, Eggers HJ, Fleischer B, Marre R, Pfister H, Pulverer G, Hrsg. *Medizinische Mikrobiologie*. Achte Aufl. München: Urban & Fischer, 562-571.
- 175 Schnipper LE, Crumpacker CS. 1980. Resistance of Herpes Simplex Virus to Acycloguanosine: Role of Viral Thymidine Kinase and DNA Polymerase Loci. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77(4):2270–2273.
- 176 Schubert A, Gentner E, Bohn K, Schwarz M, Mertens T, Sauerbrei A. 2014. Single Nucleotide Polymorphisms of Thymidine Kinase and DNA Polymerase Genes in Clinical Herpes Simplex Virus Type 1 Isolates Associated with Different Resistance Phenotypes. *Antiviral Res*, 107(7):16–22.
- 177 Sevilla J, Fernandez-Plaza S, Gonzalez-Vicent M, Colmenero I, Echevarria JM, Perez A, Diaz MA, Madero L. 2004. Fatal Hepatic Failure Secondary to Acute Herpes Simplex Virus Infection. *J Pediatr Hematol Oncol*, 26(10):686–688.
- 178 Shin YK, Cai GY, Weinberg A, Leary JJ, Levin MJ. 2001. Frequency of Acyclovir-resistant Herpes Simplex Virus in Clinical Specimens and Laboratory Isolates. *J Clin Microbiol*, 39(3):913–917.
- 179 Shukla D, Spear PG. 2001. Herpesviruses and Heparan Sulfate: An Intimate Relationship in Aid of Viral Entry. *J Clin Invest*, 108(4):503–510.
- 180 Smith KO, Kennell WL, Poirier RH, Lynd FT. 1980. In Vitro and in Vivo Resistance of Herpes Simplex Virus to 9-(2-Hydroxyethoxymethyl)Guanine (Acycloguanosine). *Antimicrob Agents Chemother*, 17(2):144–150.

- 
- 181 Snoeck R, Andrei G, Clercq E de, Gerard M, Clumeck N, Tricot G, Sadzot-Delvaux C. 1993. A New Topical Treatment for Resistant Herpes Simplex Infections. *NEJM*, 329(13):968–969.
- 182 Sodeik B, Ebersold MW, Helenius A. 1997. Microtubule-Mediated Transport of Incoming Herpes Simplex Virus 1 Capsids to the Nucleus. *J Cell Biol*, 136(5):1007–1021.
- 183 Spear PG, Eisenberg RJ, Cohen GH. 2000. Three Classes of Cell Surface Receptors for Alphaherpesvirus Entry. *Virology*, 275(1):1–8.
- 184 Stránská R. 2004. Antiviral Drug Resistance of Herpes Simplex Virus [Dissertation]. Utrecht: Universiteit Utrecht.
- 185 Stránská R, van Loon, Anton M, Polman M, Beersma, Matthias F C, Bredius, Robbert G M, Lankester AC, Meijer E, Schuurman R. 2004. Genotypic and Phenotypic Characterization of Acyclovir-Resistant Herpes Simplex Viruses Isolated from Haematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *Antivir Ther*, 9(4):565–575.
- 186 Studier FW, Moffatt BA. 1986. Use of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to Direct Selective High-level Expression of Cloned Genes. *J Mol Biol*, 189(1):113–130.
- 187 Suttorp N, Mielke M, Kiehl W, Stück B. 2004. Infektionskrankheiten verstehen, erkennen, behandeln. Erste Aufl. Stuttgart: Thieme.
- 188 Swetter SM, Hill EL, Kern ER, Koelle DM, Posavad CM, Lawrence W, Safrin S. 1998. Chronic Vulvar Ulceration in an Immunocompetent Woman due to Acyclovir-Resistant, Thymidine Kinase-Deficient Herpes Simplex Virus. *J Infect Dis*, 177(3):543–550.
- 189 Swierkosz EM, Scholl DR, Brown JL, Jollick JD, Gleaves CA. 1987. Improved DNA Hybridization Method for Detection of Acyclovir-Resistant Herpes Simplex Virus. *Antimicrob Agents Chemother*, 31(10):1465–1469.
- 190 Taylor TJ, Brockman MA, McNamee EE, Knipe DM. 2002. Herpes Simplex Virus. *Front Biosci*, 6(7):752–764.



- 
- 191 Thieu-Simchen VA. 2007. Entwicklung neuer Methoden zur Ergebnisvalidierung in der massenspektrometrischen Proteomanalytik [Dissertation]. Gießen: Justus-Liebig-Universität Gießen.
- 192 Thurlow JK, Murphy M, Stow ND, Preston VG. 2006. Herpes Simplex Virus Type 1 DNA-Packaging Protein UL17 is Required for Efficient Binding of UL25 to Capsids. *J Virol*, 80(5):2118–2126.
- 193 Tying S, Wald A, Zadeikis N, Dhadda S, Takenouchi K, Rorig R. 2012. ASP2151 for the Treatment of Genital Herpes: a Randomized, Double-blind, Placebo- and Valacyclovir-Controlled, Dose-finding Study. *J Infect Dis*, 205(7):1100–1110.
- 194 Umbach JL, Kramer MF, Jurak I, Karnowski HW, Coen DM, Cullen BR. 2008. MicroRNAs Expressed by Herpes Simplex Virus 1 During Latent Infection Regulate Viral mRNAs. *Nature*, 454(7205):780–783.
- 195 van Velzen M, Missotten T, van Loenen, Freek B., Meesters, Roland J. W., Luider TM, Baarsma, G. Seerp, Osterhaus, Albert D. M. E., Verjans, Georges M. G. M. 2013. Acyclovir-Resistant Herpes Simplex Virus Type 1 in Intra-Ocular Fluid Samples of Herpetic Uveitis Patients. *J Clin Virol*, 57(3):215–221.
- 196 van Velzen M, van Loenen, Freek B, Meesters, Roland J W, Graaf M de, Remeijer L, Luider TM, Osterhaus, Albert D M E, Verjans, Georges M G M. 2012. Latent Acyclovir-resistant Herpes Simplex Virus Type 1 in Trigeminal Ganglia of Immunocompetent Individuals. *J Infect Dis*, 205(10):1539–1543.
- 197 Vider-Shalit T, Fishbain V, Raffaeli S, Louzoun Y. 2007. Phase-Dependent Immune Evasion of Herpesviruses. *J Virol*, 81(17):9536–9545.
- 198 Wade JC, McLaren C, Meyers JD. 1983. Frequency and Significance of Acyclovir-Resistant Herpes Simplex Virus Isolated from Marrow Transplant Patients Receiving Multiple Courses of Treatment with Acyclovir. *J Infect Dis*, 148(6):1077–1082.
- 199 Wagner MJ, Sharp JA, Summers WC. 1981. Nucleotide Sequence of the Thymidine Kinase Gene of Herpes Simplex Virus Type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(3):1441–1445.

- 
- 200 Wang Y, Wang Q, Zhu Q, Zhou R, Liu J, Peng T. 2011. Identification and Characterization of Acyclovir-resistant Clinical HSV-1 Isolates from Children. *J Clin Virol*, 52(2):107–112.
- 201 Ward PL, Roizman B. 1994. Herpes Simplex Genes: The Blueprint of a Successful Human Pathogen. *Trends Genet*, 10(8):267–274.
- 202 Warrell DA. 1990. *Infektionskrankheiten*. Erste Aufl. Weinheim: Edition Medizin, VCH.
- 203 Weir JP. 2001. Regulation of Herpes Simplex Virus Gene Expression. *Gene*, 271(2):117–130.
- 204 Weiss HA, Buve A, Robinson NJ, van Dyck E, Kahindo M, Anagonou S, Musonda R, Zekeng L, Morison L, Carael M, Laga M, Hayes RJ. 2001. The Epidemiology of HSV-2 Infection and its Association with HIV Infection in Four Urban African Populations. *AIDS*, 15(Suppl 4):97–108.
- 205 Whitley RJ. 1982. Epidemiology of Herpes Simplex Virus. In: Roizman B, Hrsg. *The Herpesviruses*. Erste Aufl. New York: Plenum Press, 1-44.
- 206 Whitley RJ, Kimberlin DW, Roizman B. 1998. Herpes Simplex Viruses. *Clin Infect Dis*, 26(3):541–553.
- 207 Whitley RJ, Roizman B. 2001. Herpes Simplex Virus Infections. *Lancet*, 357(9267):1513–1518.
- 208 Wild K, Böhner T, Folkers G, Schulz GE. 1997. The Structures of Thymidine Kinase from Herpes Simplex Virus Type 1 in Complex with Substrates and a Substrate Analogue. *Protein Sci*, 6(10):2097–2106.
- 209 Wildy P. 1973. Herpes: History and Classification. In: Kaplan AS, Hrsg. *The Herpesviruses*. Erste Aufl. New York: Academic Press, 1-22.
- 210 Wilson AC, Mohr I. 2012. A Cultured Affair: HSV Latency and Reactivation in Neurons. *Trends Microbiol*, 20(12):604–611.

- 211 Wutzler P. 2002. Herpesviren: Herpes-simplex-Virus Typ 1 und Typ 2, Varicella-Zoster-Virus. In: Doerr HW, Gerlich WH, Hrsg. Medizinische Virologie, Grundlagen, Diagnostik und Therapie virologischer Krankheitsbilder. Erste Aufl. Stuttgart: Thieme, 373-381.
- 212 Wutzler P, Doerr HW, Farber I, Eichhorn U, Helbig B, Sauerbrei A, Brandstadt A, Rabenau HF. 2000. Seroprevalence of Herpes Simplex Virus Type 1 and Type 2 in Selected German Populations - Relevance for the Incidence of Genital Herpes. *J Med Virol*, 61(2):201–207.
- 213 Wutzler P, Sauerbrei A. 2009. Herpesviren: Herpes-simplex-Virus Typ 1 und Typ 2, Varicella-Zoster-Virus. In: Doerr HW, Gerlich WH, Hrsg. Medizinische Virologie, Grundlagen, Diagnostik und Therapie virologischer Krankheitsbilder. Zweite Aufl. Stuttgart: Thieme, 653-335.
- 214 Wyles DL, Patel A, Madinger N, Bessesen M, Krause PR, Weinberg A. 2005. Development of Herpes Simplex Virus Disease in Patients who are Receiving Cidofovir. *Clin Infect Dis*, 41(5):676–680.
- 215 Yang H, Datema R. 1991. Prolonged and Potent Therapeutic and Prophylactic Effects of (S)-1-(3-Hydroxy-2-Phosphonylmethoxy)Propylcytosine Against Herpes Simplex Virus Type 2 Infections in Mice. *Antimicrob Agents Chemother*, 35(8):1596–1600.

# 9 Anhang

## 9.1 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Aminosäuresubstitutionen klinischer HSV-1-Stämme sowie Phänotyp.	28
Tab. 2:	Positiv- und Resistenzkontrollen.	30
Tab. 3:	Chemikalien mit Herstellerangabe.	31
Tab. 4:	Lösungen, deren Verwendung und Zusammensetzung.	32
Tab. 5:	Medien, deren Verwendung und Zusammensetzung.	33
Tab. 6:	Kitsysteme mit Herstellerangabe.	33
Tab. 7:	Geräte mit Herstellerangabe.	34
Tab. 8:	Software mit Herstellerangabe.	35
Tab. 9:	Sequenzen der mutagenen Primer.	36
Tab. 10:	Pipettierschema des Methylierungs- und Mutagenese-PCR-Ansatzes.	39
Tab. 11:	PCR-Bedingungen der Methylierungs- und Mutagenese-PCR.	39
Tab. 12:	Zusammensetzung des <i>in vitro</i> -Rekombinationsansatzes.	42
Tab. 13:	Sequenzen der Primer M13F und M13R.	43
Tab. 14:	Pipettierschema der HotStar-PCR.	43
Tab. 15:	PCR-Bedingungen der HotStar-PCR.	44
Tab. 16:	Sequenzieransatz.	45
Tab. 17:	Pipettierschema zur Proteinsynthese mittels Qiagen-Kit.	47
Tab. 18:	Pipettierschema zur Proteinsynthese mittels Bioneer-Kit.	47
Tab. 19:	Konzentrationen der BSA-Standardreihe.	50
Tab. 20:	Zusammensetzung des 12,5%igen SDS-Gels.	51

---

Tab. 21: Verdünnungsstufen der Proteine für den DiviTum <sup>TM</sup> -Test mit nicht aufgereinigten Proteinen.	53
Tab. 22: Kriterien zur Einteilung der TK-Aktivität mittels DiviTum <sup>TM</sup> -Test.	54
Tab. 23: Verdünnungsstufen der Proteine für den DiviTum <sup>TM</sup> -Test mit aufgereinigten Proteinen.	55
Tab. 24: Konzentrationen des Salzgradienten.	55
Tab. 25: Kriterien zur Einteilung der TK-Aktivität gegenüber ACV bzw. dT mittels HPLC/UV.	56
Tab. 26: Einteilung der Resistenzmutanten in die Kategorien TK <sup>-</sup> , TK <sup>R</sup> und TK <sup>A</sup> .	57
Tab. 27: Einstellung der Parameter bei ESI.	58
Tab. 28: Zusätzliche unbekannte oder unklare AS-Substitutionen.	62
Tab. 29: Aktivitäten der mittels Qiagen-Kit synthetisierten, nicht aufgereinigten Kontrollproben in DU/l bei Verwendung von DiviTum <sup>TM</sup> -Kits der ersten Charge, bestimmt nach der finalen Inkubationszeit von 180 min.	71
Tab. 30: Aktivitäten der mittels Qiagen-Kit synthetisierten, nicht aufgereinigten Kontrollproben in DU/l bei Verwendung von DiviTum <sup>TM</sup> -Kits der zweiten Charge, bestimmt nach der finalen Inkubationszeit von 180 min.	72
Tab. 31: Aktivitäten der mittels Bioneer-Kit synthetisierten, nicht aufgereinigten Kontrollproben in DU/l bei Verwendung von DiviTum <sup>TM</sup> -Kits der zweiten Charge, bestimmt nach der finalen Inkubationszeit von 180 min.	72
Tab. 32: Bewertung der TK-Aktivität der rekombinanten, nicht aufgereinigten Proteine aus dem Qiagen-Kit bei Anwendung von DiviTum <sup>TM</sup> -Kits der ersten Charge.	74
Tab. 33: Bewertung der TK-Aktivität der rekombinanten, nicht aufgereinigten Proteine aus dem Qiagen-Kit bei Anwendung von DiviTum <sup>TM</sup> -Kits der zweiten Charge.	74

---

Tab. 34: Bewertung der TK-Aktivität der rekombinanten, nicht aufgereinigten Proteine aus dem Bioneer-Kit bei Anwendung von DiviTum <sup>TM</sup> -Kits der zweiten Charge.	74
Tab. 35: Aktivitäten der rekombinanten, nicht aufgereinigten Proteine aus dem Qiagen Kit in DU/I bei Verwendung von DiviTum <sup>TM</sup> -Kits der ersten Charge, bestimmt nach der finalen Inkubationszeit von 180 min.	75
Tab. 36: Aktivitäten der rekombinanten, nicht aufgereinigten Proteine aus dem Qiagen Kit in DU/I bei Verwendung von DiviTum <sup>TM</sup> -Kits der zweiten Charge, bestimmt nach der finalen Inkubationszeit von 180 min.	75
Tab. 37: Aktivitäten der rekombinanten, nicht aufgereinigten Proteine aus dem Bioneer-Kit in DU/I bei Verwendung von DiviTum <sup>TM</sup> -Kits der zweiten Charge, bestimmt nach der finalen Inkubationszeit von 180 min.	76
Tab. 38: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse des DiviTum <sup>TM</sup> -Tests mit zellfrei synthetisierten, nicht aufgereinigten Proteinen.	78
Tab. 39: Ergebnisse des DiviTum <sup>TM</sup> -Tests der aufgereinigten Kontrollproben im Vergleich zur nicht aufgereinigten WT-TK.	80
Tab. 40: Bewertung der TK-Aktivität der aufgereinigten Proteine.	81
Tab. 41: Aktivitäten der <i>in vivo</i> synthetisierten, aufgereinigten Proteine in DU/I bei Verwendung von DiviTum <sup>TM</sup> -Kits der zweiten Charge, bestimmt nach der finalen Inkubationszeit von 180 min.	81
Tab. 42: Vergleich der Phosphorylierungsaktivität von aufgereinigtem und nicht aufgereinigtem WT 232-Protein im DiviTum <sup>TM</sup> -Test nach einer Inkubationszeit von 30 min.	82
Tab. 43: Spezifische Retentionszeiten der Standardproben gemessen mittels HPLC/UV.	83

---

Tab. 44: Mittels HPLC/UV ermittelte Konzentrationen an ACV, ACV-MP sowie Angabe des $k_{\text{cat}}$ nach Inkubation der <i>in vivo</i> synthetisierten, aufgereinigten Proteine WT 232 (PK) und R216H (zRK) in Phosphorylierungspuffer mit ACV und ATP.	86
Tab. 45: Mittels HPLC/UV ermittelte Konzentrationen an dT, dTMP sowie Angabe des $k_{\text{cat}}$ nach Inkubation der <i>in vivo</i> synthetisierten, aufgereinigten Proteine WT 232 (PK) und R216H (zRK) in Phosphorylierungspuffer mit dT und ATP.	87
Tab. 46: Mittels HPLC/UV ermittelte Konzentrationen an ATP, ADP sowie Angabe des $k_{\text{cat}}$ nach Inkubation der <i>in vivo</i> synthetisierten, aufgereinigten Proteine WT 232 (PK) und R216H (zRK) in Phosphorylierungspuffer mit ACV oder dT.	87
Tab. 47: Bewertung der TK-Aktivität der <i>in vivo</i> synthetisierten, aufgereinigten Proteine mittels HPLC/UV gegenüber ACV bzw. dT.	88
Tab. 48: Mittels HPLC/UV erhaltene Ergebnisse für ACV-MP sowie Angabe des $k_{\text{cat}}$ nach Inkubation der <i>in vivo</i> synthetisierten, aufgereinigten Proteine R32H, N244H und G264V in Phosphorylierungspuffer mit ACV oder dT und ATP.	90
Tab. 49: Mittels LC/MS/MS ermittelte Konzentrationen an ACV und ACV-MP nach Inkubation der aufgereinigten Proteine WT 232 (PK) und R216H (zRK) sowie des nicht aufgereinigten Proteins WT 232 in Phosphorylierungspuffer mit ACV und ATP	95

## 9.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Genomorganisation des HSV.	5
Abb. 2: Struktur der TK des HSV-1.	6
Abb. 3: Struktur des HSV-1-TK-Dimers.	7
Abb. 4: Struktur der DNA-Pol des HSV-1.	8
Abb. 5: Aufbau des HSV.	8
Abb. 6: Lytischer Replikationszyklus des HSV.	11
Abb. 7: Latenz (a) und Virusreaktivierung (b).	13
Abb. 8: Klinische Manifestationen des HSV-1.	15
Abb. 9: Überführung von ACV in seine Wirkform und Wirkungsentfaltung.	18
Abb. 10: Weitere Nukleosidanaloga.	19
Abb. 11: Foscarnet.	19
Abb. 12: Cidofovir.	20
Abb. 13: Behandlungsalgorithmus bei Medikamentenresistenz von HSV.	25
Abb. 14: Aufbau der mutagenen Primer am Beispiel der Substitution Q15K.	36
Abb. 15: Elektrophoresebild nach Methyl- und Mutagenese-PCR.	59
Abb. 16: Gelbild der Kolonie-PCR der Mutation V238F.	60
Abb. 17: Elektrophoresebild nach Midi-PCR.	61
Abb. 18: Restriktionsenzymverdau des Plasmids mit der Substitution A93V.	62
Abb. 19: Western Blot der mittels Qiagen-Kit synthetisierten rekombinanten Proteine WT 232 (PK), pIX3.0 (NK), Q250Stopp (RK), Q15K, R32H und E43A.	64



- Abb. 20: Western Blot der mittels Qiagen-Kit synthetisierten rekombinanten Proteine WT 232 (PK), pIX3.0 (NK), Q250Stopp (RK), R89H, A93V, L170P (zRK) und N244H. 64
- Abb. 21: Western Blot der mittels Qiagen-Kit synthetisierten rekombinanten Proteine WT 232 (PK), pIX3.0 (NK), Q250Stopp (RK), M121K und A156P (zPK). 64
- Abb. 22: Western Blot der mittels Bioneer-Kit synthetisierten rekombinanten Proteine WT 232 (PK), pIX3.0 (NK), Q250Stopp (RK), A156V, S181N (zRK), R216H (zRK), G264V und P268M (zPK). 65
- Abb. 23: Western Blot der mittels Bioneer-Kit synthetisierten rekombinanten Proteine WT 232 (PK), pIX3.0 (NK), Q250Stopp (RK), P269S, G271V, I326V und N376Stopp. 65
- Abb. 24: Western Blot der mittels Bioneer-Kit synthetisierten rekombinanten Proteine WT 232 (PK), pIX3.0 (NK), Q250Stopp (RK), R20C, E43D, R89H und T183Stopp (zRK). 66
- Abb. 25: Western Blot der mittels Bioneer-Kit synthetisierten rekombinanten Proteine WT 232 (PK), pIX3.0 (NK), Q250Stopp (RK), G61E, R163G, P173Deletion, V238F und S276N. 66
- Abb. 26: Western Blot mittels anti-His6-AK des nicht aufgereinigten WT 232 sowie eines humanen Aprataxin-Proteins als PK. 67
- Abb. 27: Western Blot der aufgereinigten Proteine WT 232 (PK), R32H, R216H (zRK), N244H und G264V. 68
- Abb. 28: Coomassie-Färbung der Aufreinigungsfractionen des *in vivo* exprimierten WT 232-Proteins (Teil 1). 69
- Abb. 29: Coomassie-Färbung der Aufreinigungsfractionen des *in vivo* exprimierten WT 232-Proteins (Teil 2). 69

---

Abb. 30: Dritte Elutionsfraktionen der aufgereinigten Proteine.	70
Abb. 31: Phosphorylierungsaktivität der Proteine aus dem Qiagen-Kit, die mittels DiviTum <sup>TM</sup> -Kits der ersten Charge getestet wurden.	78
Abb. 32: Phosphorylierungsaktivität der Proteine aus dem Qiagen-Kit, die mittels DiviTum <sup>TM</sup> -Kits der zweiten Charge getestet wurden.	79
Abb. 33: Phosphorylierungsaktivität der Proteine aus dem Qiagen-Kit, die mittels DiviTum <sup>TM</sup> -Kits der ersten Charge getestet wurden.	79
Abb. 34: Phosphorylierungsaktivität der aufgereinigten Proteine.	82
Abb. 35: Bestimmung der spezifischen Retentionszeit des Standards ATP mittels HPLC.	83
Abb. 36: Detektion von ACV, ACV-MP, ATP und ADP mittels HPLC/UV nach Inkubation der <i>in vivo</i> exprimierten und aufgereinigten PK WT 232 mit ACV.	84
Abb. 37: Detektion von ACV, ACV-MP, ATP und ADP mittels HPLC/UV nach Inkubation der <i>in vivo</i> exprimierten und aufgereinigten PK WT 232 mit dT.	84
Abb. 38: Detektion von ACV, ACV-MP, ATP und ADP mittels HPLC/UV nach Inkubation der <i>in vivo</i> exprimierten und aufgereinigten zRK R216H mit ACV.	85
Abb. 39: Detektion von ACV, ACV-MP, ATP und ADP mittels HPLC/UV nach Inkubation der <i>in vivo</i> exprimierten und aufgereinigten zRK R216H mit dT.	85
Abb. 40: Detektion von ACV, ACV-MP, ATP und ADP mittels HPLC/UV nach Inkubation des <i>in vivo</i> exprimierten und aufgereinigten Proteins mit der AS-Substitution R32H mit ACV.	89
Abb. 41: Detektion von ACV, ACV-MP, ATP und ADP mittels HPLC/UV nach Inkubation des <i>in vivo</i> exprimierten und aufgereinigten Proteins mit der AS-Substitution R32H mit dT.	89

---

Abb. 42: Detektion von ACV, ACV-MP, ATP und ADP mittels HPLC/UV nach Inkubation des <i>in vivo</i> exprimierten und aufgereinigten Proteins mit der AS-Substitution N244H mit ACV.	89
Abb. 43: Detektion von ACV, ACV-MP, ATP und ADP mittels HPLC/UV nach Inkubation des <i>in vivo</i> exprimierten und aufgereinigten Proteins mit der AS-Substitution N244H mit dT.	89
Abb. 44: Detektion von ACV, ACV-MP, ATP und ADP mittels HPLC/UV nach Inkubation des <i>in vivo</i> exprimierten und aufgereinigten Proteins mit der AS-Substitution G264V mit ACV.	89
Abb. 45: Detektion von ACV, ACV-MP, ATP und ADP mittels HPLC/UV nach Inkubation des <i>in vivo</i> exprimierten und aufgereinigten Proteins mit der AS-Substitution G264V mit dT.	89
Abb. 46: Fragmentprofil von ACV in der LC/MS/MS.	91
Abb. 47: Fragmentprofil von ACV-MP in der LC/MS/MS.	92
Abb. 48: Spektrum nach Inkubation von ACV mit der aufgereinigten PK WT 232 bei Messung von ACV (positive Ionisierung).	93
Abb. 49: Spektrum nach Inkubation von ACV mit der aufgereinigten PK WT 232 bei Messung von ACV (negative Ionisierung).	93
Abb. 50: Spektrum nach Inkubation von ACV mit dem nicht aufgereinigten WT 232-Proteingemisch bei Messung von ACV (positive Ionisierung).	93
Abb. 51: Spektrum nach Inkubation von ACV mit dem nicht aufgereinigten WT 232-Proteingemisch bei Messung von ACV-MP (negative Ionisierung).	94
Abb. 52: Spektrum nach Inkubation von ACV mit der aufgereinigten zRK R216H bei Messung von ACV (positive Ionisierung).	94
Abb. 53: Spektrum nach Inkubation von ACV mit der aufgereinigten zRK R216H bei Messung von ACV-MP (negative Ionisierung).	94

Abb. 54: Lage der untersuchten AS-Substitutionen im TK-Gen.

114

### 9.3 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Andreas Sauerbrei, Direktor des Instituts für Virologie und Antivirale Therapie, für die Vergabe des interessanten Themas sowie für die intensive Betreuung und konstruktive Kritik während der Erstellung der Arbeit.

Nicht minder schätze ich die Unterstützung durch Frau Dr. Kathrin Bohn-Wippert beim Einstieg in die Laborarbeit und die hilfreichen Diskussionen, für die sie sich immer Zeit genommen hat. Ebenso möchte ich mich für die zahllosen Ratschläge und die angenehme Arbeitsatmosphäre bei Kristin Liermann, Heike Urban und Martina Richter bedanken. Zudem geht ein großer Dank an Christina Bornschein, die sich wunderbar um sämtliche organisatorische Belange und Fragen gekümmert hat.

Ein weiteres Dankeschön gebührt unseren Kooperationspartnern vom Leibniz-Institut für Altersforschung - Fritz-Lipmann-Institut e.V. für die Ermöglichung der Messungen mittels HPLC/UV. Dabei bin ich insbesondere Dr. Matthias Görlach, Dr. Peter Bellstedt und Sabine Häfner für ihre Unterstützung dankbar.

Die Versuche mittels LC/MS/MS konnten dank Herrn Prof. Dr. Markus Gräler am Massenspektrometer der AG Sepsisforschung des Universitätsklinikums Jena umgesetzt werden. In diesem Rahmen möchte ich besonders Christina-Maria Reimann für ihre Hilfe bei der Einarbeitung und die Durchführung der Messungen meinen Dank aussprechen.

Dem Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung (IZKF) des Universitätsklinikums Jena danke ich für die Gewährung eines Promotionsstipendiums für zwölf Monate.

Außerdem danke meinen Freundinnen Lena, Charlotte, Maria und Olivia für ihre Geduld und die ermutigenden Worte, mit denen sie mir im Studium und während der Promotionszeit zur Seite standen.

Zu guter Letzt gilt ein besonderer Dank meinen Eltern, meiner Schwester sowie meinem Freund, die immer an mich glauben, stets hinter mir stehen und mich in jeder Lebenslage unterstützt haben. Durch euch wurden mein Medizinstudium und das Gelingen dieser Arbeit erst ermöglicht.

#### **9.4 Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Herr Prof. Dr. med. Andreas Sauerbrei, Herr Dr. rer. nat. Matthias Görlach und Frau Dr. rer. nat. Kathrin Bohn-Wippert,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 30. September 2016

Marisa Kaspar